



UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Facultad de Química

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología

Instituto de Investigación y Análisis Alimentario

**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE
PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN
DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN
MATRICES MEDIOAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**

MARÍA TERESA PENA SENDÓN

Memoria para optar al grado de Doctora en Química

Santiago de Compostela, marzo de 2010

D. Antonio Moreda Piñeiro, Profesor Titular y Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Informa:

Que **Dña María Teresa Pena Sendón** ha realizado en este departamento el trabajo recogido en la memoria titulada "**DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS**" bajo la dirección de las Profesoras Dña María del Carmen Casais Laíño y María del Carmen Mejuto Martí en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela, que presenta para optar al grado de Doctora en Química.

Y para que así conste, firmo el presente informe en Santiago de Compostela, marzo 2010

D. Antonio Moreda Piñeiro

Dña María del Carmen Casais Laíño y Dña María del Carmen Mejuto Martí, Profesoras Titulares del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la licenciada **Dña María Teresa Pena Sendón** a la presentación del trabajo recogido en la memoria titulada **“DESARROLLO DE NUEVAS METODOLOGÍAS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS EN MATRICES MEDIOAMBIENTALES Y ALIMENTARIAS”** que ha realizado bajo su dirección en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela, para optar al grado de Doctora en Química

Y para que así conste, firmamos el presente informe en Santiago de Compostela, marzo 2010.

Dña María del Carmen Casais Laíño

Dña María del Carmen Mejuto Martí

“O verdadeiro heroísmo consiste em trocar os anseios em realidades, as ideias em feitos”

A. D. Rodríguez Castelao (1886-1950)



*There are some lovely places that stand out in my mind as being very special
and magical, it's impossible to say why...*

Maité

Agradecimientos

En determinados momentos de la vida, es necesario tomar ciertas decisiones, que de antemano, no sabes si van a ser las más adecuadas. Después de pasar más de media vida estudiando, cuando terminas la Licenciatura, surgen sentimientos de desorientación y dudas. Es el momento de elegir un camino que repercutirá en tu futuro, y te preguntas cuál será la mejor alternativa. En “Aquellos Tiempos”, mi decisión fue la de continuar mi carrera, realizando la Tesis Doctoral. Ahora, con el transcurso de los años, siento que no me he equivocado, ya que he adquirido nuevos conocimientos y he aprendido muchas cosas tanto a nivel profesional como personal. Estos sentimientos no serían los mismos, si no hubiese contado con el apoyo y la ayuda de muchas personas, que han contribuido en gran medida a que este proyecto haya alcanzado su fin.

En primer lugar, quisiera agradecer a mis directoras Carmela y Mamen, la confianza que depositaron en mí, la formación recibida y el brindarme la oportunidad de realizar este trabajo.

Mi más sincero agradecimiento a Rafael, no sólo por haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para la realización de esta Tesis, sino también por darme su apoyo, transmitirme su pasión por la investigación, y contar con su ayuda en todo momento.

Mi agradecimiento también al Ministerio de Educación y Ciencia por la beca FPI, disfrutada durante el desarrollo de esta Tesis, y a los fondos autonómicos, estatales y europeos por la financiación a través de los proyectos BQU-2003-02090, PGIDIT04PXIC23701PN, CTQ2006-03334/BQU Y PGIDIT06PXIB237039PR.

Quiero aprovechar estas líneas para agradecerle a Diego su ayuda en la optimización del método de GC-MS/MS, ya que sus conocimientos en este campo, sus ideas con los grandes volúmenes y sus explicaciones acerca del manejo del equipo, han facilitado enormemente el desarrollo del nuevo método.

A mis compañeros del IIAA, gente maravillosa con la que he compartido muchos momentos; en especial a Eva, Rosa, Mónica, Carmen, Juan, Diego y Brais que han dejado de ser mis compañeros de laboratorio para convertirse en muy buenos amigos. Aunque nuestros caminos profesionales nos separen, siempre estareis en mi corazón. Gracias por todo L.O.

A Pascual, por TODO. Expresar o meu agradecemento en palabras resultaría imposible, xa que necesitaría varias memorias como esta, para recoller todos os detalles que recibo cada día. Gracias Pas por ser como eres, por facerme rir, por axudarme e apoiarme sempre en todo, por coidarme, e facer que sexa realmente feliz. Sabes que che quero e que si este traballo está adicado a alguén, ese eres ti.

A unha rapaza de 18 anos, que cambiou as festas no “Paraíso” e a música dos “Pecos” para fundar a súa familia. Gracias Mamá por coidarnos tanto, querernos e anteponer o noso benestar por enriba de todo. Queroche moito e desexo que sexas moi feliz.

Un bo día, un neno deume unha postal que dicía: “La verdadera amistad se demuestra en los momentos difíciles”. Probablemente hoxe en día, o neno (agora xa un home) nin se acorde desta postal, pero eu gardeina con gran agarimo. Gracias Ismael, porque ademáis de ser meu irmán, eres un bo amigo. Sei que sempre conto e contarei contigo nos momentos difíciles, e ti sempre contarás connigo.

A meus avós, que sempre me apoiaron, gracias por estar ahí.

Tamén quero adicar unhas palabras especiais, para a muller máis fermosa que coñecín, abuela de Muros. Aínda que non estés, as dúas sabemos o que sentimos, “Cantaré por ti, si no estás junto a mí”.

Finalmente, quixera agradecer a toda a miña familia e os meus amig@s o seu apoio, porque a miña vida non sería a mesma sin eles.

Gracias a todos.

Maite

A Pascual

ÍNDICE

CAPÍTULO I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS **1**

CAPÍTULO II. INTRODUCCIÓN **5**

1. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS **7**

1.1. Definición, estructura y propiedades	7
1.2. Origen y fuentes	11
1.2.1. Formación de PAHs	11
1.2.2. Fuentes de emisión al medio ambiente	12
1.2.2.1. Fuentes naturales	12
1.2.2.2. Fuentes antropogénicas	13
1.3. Distribución en el medio ambiente	18
1.4. Toxicidad	30
1.4.1. Evaluación medioambiental	30
1.4.2. Toxicología y efectos para la salud	32
1.4.3. Metabolismo	35
1.5. Legislación	36

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS **41**

2.1. Métodos de preparación de muestras acuosas	42
2.1.1. Técnicas tradicionales	42
2.1.1.1. Extracción líquido-líquido	42
2.1.1.2. Extracción en fase sólida	42
2.1.2. Técnicas de microextracción	44
2.1.2.1. Microextracción con gota suspendida	45
2.1.2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva	47
2.1.2.2.1. Principios de la técnica	47
2.1.2.2.2. Variables que afectan al proceso de extracción	49
2.1.2.2.3. Aplicaciones de DLLME	51
2.1.2.2.4. Desarrollos recientes de DLLME	55
2.1.2.2.4.1. Líquidos iónicos como fase extractante	57
2.1.2.3. Microextracción en fase líquida con fibra hueca	60
2.1.2.4. Extracción con disolventes asistida por membranas	61

2.1.2.5. Microextracción en fase sólida	62
2.1.2.6. Extracción con barras agitadoras	63
2.1.3. Otras técnicas alternativas	65
2.1.3.1. Extracción por punto nube (<i>cloud point extraction</i>)	65
2.2. Métodos de preparación de muestras sólidas	66
2.2.1. Extracción Soxhlet	66
2.2.2. Extracción asistida por ultrasonidos	67
2.2.3. Extracción con fluidos supercríticos	68
2.2.4. Extracción asistida por microondas	70
2.2.4.1. Principios de la técnica	71
2.2.4.1.1. Calentamiento mediante energía de microondas	71
2.2.4.1.1. Mecanismo de extracción con disolventes	72
2.2.4.2. Variables que afectan al proceso de extracción	73
2.2.4.3. Aplicaciones de MAE	75
2.2.5. Extracción con líquidos presurizados	78
2.2.5.1. Principios de la técnica	79
2.2.5.1.1. Consideraciones físico-químicas	79
2.2.5.1.2. Mecanismo de extracción con disolventes	80
2.2.5.2. Variables que afectan al proceso de extracción	83
2.2.5.3. Aplicaciones de PLE	85
2.2.6. Dispersión de la matriz en fase sólida	88
2.2.6.1. Principios de la técnica	88
2.2.6.1.1. Etapas de la MSPD	89
2.2.6.2. Variables que afectan al proceso de extracción	90
2.2.6.3. Aplicaciones de la MSPD	92
2.3. Métodos de purificación de extractos	95
2.4. Métodos de determinación	97
2.4.1. Cromatografía líquida	97
2.4.1.1. Separación de PAHs mediante HPLC	98
2.4.1.2. Sistemas de detección	99
2.4.2. Cromatografía de gases	101
2.4.2.1. Separación de PAHs mediante GC	102
2.4.2.2. Inyección de grandes volúmenes	103
2.4.2.3. Sistemas de detección	104

CAPÍTULO III. EXPERIMENTAL	149
1. PATRONES, DISOLVENTES Y REACTIVOS	151
1.1. Patrones comerciales	151
1.2. Reactivos, gases y disolventes	152
2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL	153
2.1. Material general	153
2.2. Instrumentación para la determinación	156
3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	157
3.1. Preparación de disoluciones estándar de analitos	157
3.2. Otras disoluciones	158
3.3. Fases móviles para HPLC	159
3.4. Conservación de las disoluciones	159
4. MUESTRAS ESTUDIADAS	159
4.1. Muestras y preparación de muestras	159
4.2. Determinación de la humedad y del contenido graso de las muestras. Análisis elemental	161
4.3. Contaminación de las muestras	162
4.4. Materiales de referencia	162
4.5. Conservación de las muestras	163
4.6. Determinación del residuo seco	163
5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL	163
5.1. Acondicionamiento de adsorbentes	163

5.2. Lavado del material	164
6. GESTIÓN DE RESIDUOS	165
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSION	167
1. DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS SÓLIDAS	171
1.1. Determinación de PAHs en material biológico	172
1.1.1. Introducción	172
1.1.2. Optimización de un método de extracción asistida por microondas para el análisis de PAHs en muestras de pescado	175
Publicación I <i>Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples.</i>	
1.1.3. Consideraciones adicionales y conclusiones	193
1.2. Determinación de PAHs en lodos de depuradora de aguas residuales	195
1.2.1. Introducción	195
1.2.2. Procedimiento de preparación de muestras de lodo y suelo mediante extracción y saponificación asistidas por microondas	199
Publicación II <i>Sample preparation of sewage sludge and soil samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on one-pot microwave-assisted saponification and extraction.</i>	
1.2.3. Optimización de un procedimiento de preparación de muestra basado en la dispersión de la matriz en fase sólida para el análisis de PAHs en suelo	219
Publicación III <i>Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction.</i>	

1.2.4. Desarrollo de un método de dispersión de la matriz en fase sólida para la determinación de PAHs en muestras de lodo	241
<u>Publicación IV</u> <i>Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples.</i>	
1.2.5. Desarrollo de un procedimiento de preparación de muestras de lodo mediante extracción selectiva con líquidos presurizados	271
<u>Publicación V</u> <i>Development of a sample preparation procedure of sewage sludge sample for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction.</i>	
1.2.6. Consideraciones adicionales y conclusiones	303
2. DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS ACUOSAS	317
2.1. Determinación de PAHs en agua	319
2.1.1. Introducción	319
2.1.2. Desarrollo de un método de microextracción líquido-líquido dispersiva para el análisis de PAHs en muestras de agua	321
<u>Publicación VI</u> <i>Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples.</i>	
2.1.3. Consideraciones adicionales y conclusiones	353
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	357
ACRÓNIMOS	359

CAPÍTULO I

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Una gran parte de la humanidad actual, vive en una sociedad industrial altamente compleja. En poco más de un siglo, los avances en medicina, agricultura, electrónica, informática, química, etc. han sido tan grandes, que se ha producido una auténtica revolución.

En el siglo XX, la investigación y el desarrollo de la química han generado nuevas sustancias y materiales, que han mejorado profundamente la calidad de vida, y han contribuido, con infinidad de métodos, al avance de la tecnología. En cualquiera de nuestras casas, tenemos en la actualidad más productos químicos, que los que había en un laboratorio científico hace cien años. Medicinas, insecticidas, pinturas, productos de limpieza, conservantes de los alimentos, plásticos de envases, componentes de pilas, perfumes, jabones, etc. hacen que estemos en contacto cada día, con miles de productos químicos distintos, la mayoría sintetizados por el hombre.

Los grandes avances científicos y tecnológicos, junto con el uso no controlado de ciertos agentes químicos, han traído con ellos importantes problemas, ya que se ha ido alterando el ambiente de una forma tan poderosa, que ha llegado a ser amenazante para el equilibrio del planeta.

En la actualidad, la contaminación y la destrucción de los recursos naturales, han suscitado una creciente preocupación en la sociedad, por lo que la comunidad científica ha centrado sus esfuerzos en el estudio de la distribución, toxicidad y efectos de los agentes químicos en el medio ambiente.

Los contaminantes considerados en esta Tesis Doctoral son los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Históricamente fueron los primeros agentes químicos en ser reconocidos como causantes de tumores malignos en humanos. Con respecto a su incidencia sobre el medio ambiente, se trata de sustancias orgánicas persistentes y de difícil degradación, por lo que su permanencia en el ambiente puede durar años. Por ello, organismos internacionales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia de Protección Ambiental (EPA), han regulado el control de estas sustancias en el medio ambiente.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha sido el desarrollo de metodología analítica, que permita llevar a cabo la determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos, en muestras medioambientales de distinta naturaleza y complejidad.

I. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El trabajo se ha centrado principalmente en la optimización de nuevas metodologías sensibles y selectivas para la determinación de los analitos en muestras sólidas (material biológico, suelo y lodo de depuradora de aguas residuales), y acuosas (agua de grifo, pozo, fuente, botella, río, lluvia, y aguas residuales). La principal finalidad era desarrollar nuevas estrategias de análisis, rápidas, sencillas, baratas y respetuosas con el medio ambiente.

Las técnicas utilizadas para la extracción de los analitos de matrices sólidas, fueron la extracción asistida por microondas, la dispersión de la matriz en fase sólida, y la extracción con líquidos presurizados; mientras que la extracción líquido-líquido dispersiva, fue la técnica empleada para muestras acuosas.

En cuanto a las herramientas analíticas, la cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detección de fluorescencia, fue la técnica seleccionada para la determinación, y la cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas, fue utilizada con fines de confirmación.

CAPÍTULO II

INTRODUCCIÓN

1. HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

1.1. DEFINICIÓN, ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

Los **hidrocarburos aromáticos policíclicos** (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), constituyen una familia de compuestos ampliamente distribuida en el medio ambiente, que se caracterizan por contener dos o más anillos aromáticos unidos entre sí. Debido a su estructura singular, origen y comportamiento ambiental característico, suelen estudiarse de forma diferenciada del conjunto de hidrocarburos [1,2].

La mayoría de los PAHs contienen solamente carbono e hidrógeno, y son siempre estructuras polinucleares de tipo aromático. Generalmente están formados por anillos bencénicos fusionados, pero también existen PAHs que contienen anillos de cinco eslabones en su estructura, como el acenafteno y fluoranteno. Otros PAHs derivados contienen en sus estructuras grupos alquil sustituyentes u otros grupos funcionales (nitro, halo, carboxil, etc.) [1,3]. El naftaleno se considera el compuesto más sencillo y el coroneno, el de mayor número de anillos condensados, dentro de los PAHs de importancia medioambiental [3] (figura II.1). El grafito, constituido por capas paralelas de anillos bencénicos fusionados, se considera el PAH de mayor peso molecular [3,4].

La estabilidad de los PAHs varía en función de la disposición de los anillos. En la serie de los PAHs enlazados linealmente, la estabilidad disminuye a medida que se incrementa el número de anillos, ya que cada miembro de la serie se convierte en más olefínico, y con menor carácter aromático que su predecesor. El heptaceno es el miembro más largo de esta serie, pero su gran reactividad ha impedido la obtención del compuesto puro. En la serie de los PAHs fusionados angularmente la estabilidad no disminuye al aumentar el número de anillos, y no se ha demostrado que exista un límite máximo de anillos aromáticos fusionados [1].

1. PAHs

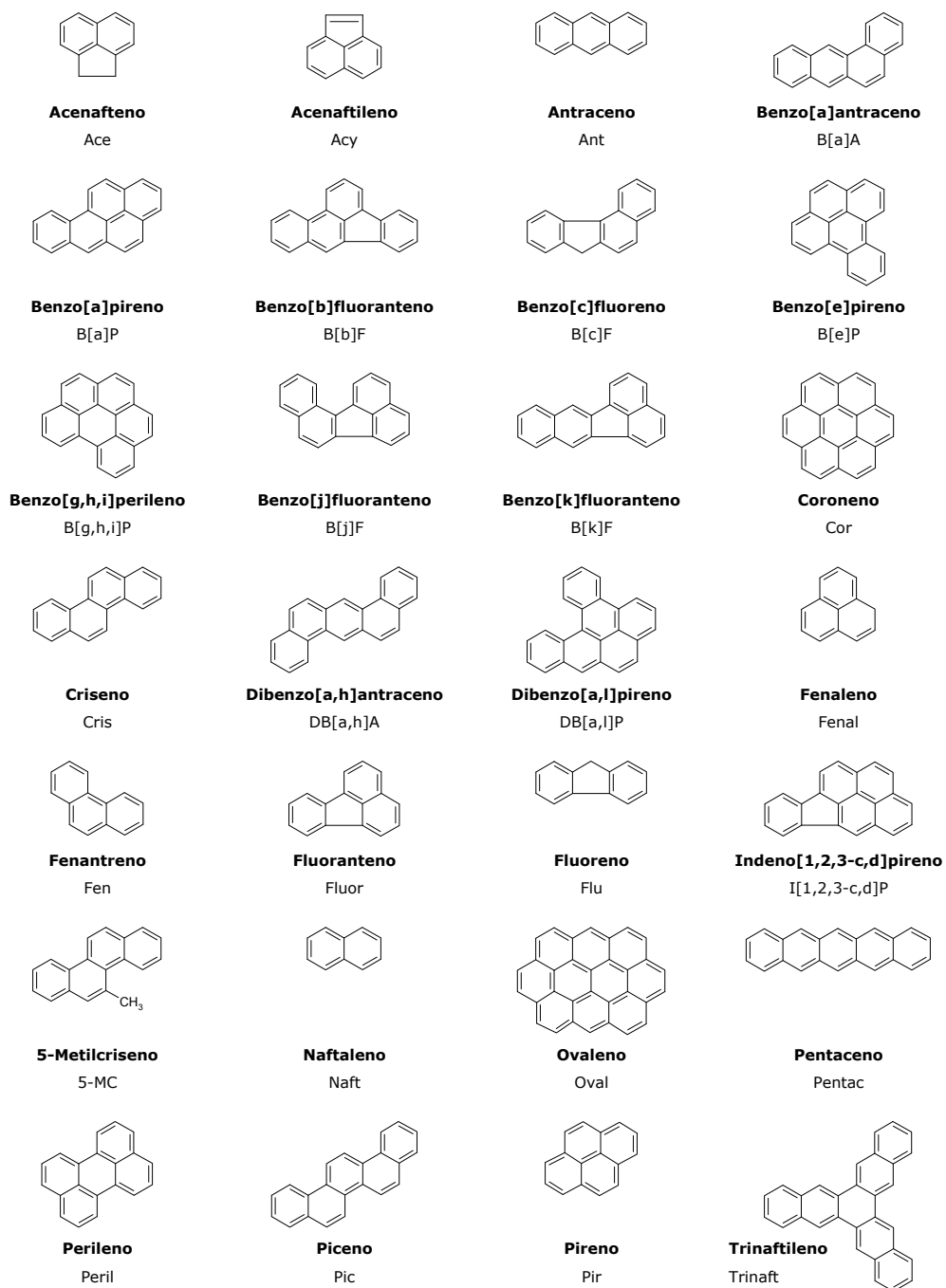


Figura. II.1. Estructura molecular de algunos PAHs de interés

Los PAHs son compuestos sólidos en condiciones ambientales, incoloros o de color blanco o amarillo pálido [5]. Son moléculas con muy baja solubilidad en agua, a la vez que elevada en disolventes orgánicos no polares, lo que les configura como compuestos típicamente microcontaminantes orgánicos, y con capacidad bioacumulativa [6]. Por lo general, un incremento en el peso molecular y en el número de anillos en su estructura, disminuyen su solubilidad en agua y su volatilidad [5,6].

En la tabla II.1 se recogen las **propiedades físico-químicas** de algunos PAHs, ya que son un factor clave a la hora de entender su comportamiento medioambiental. Como puede observarse, los valores de $\log K_{ow}$ oscilan entre 3 y 7, que es generalmente considerado el rango de compuestos lipofílicos. Como consecuencia de sus elevados coeficientes de partición octanol-agua y baja solubilidad en agua, es de esperar que los PAHs se bioacumulen y se concentren en la fase orgánica de partículas sólidas de suelos y sedimentos, convirtiéndose en contaminantes orgánicos persistentes en el medio ambiente [2,3].

Tabla II.1.1. Propiedades físico-químicas de algunos PAHs de interés medioambiental [7].

Compuesto	n° CAS	Fórmula molec.	PM	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	S (mol L ⁻¹)	log K _{ow}	Pv (kPa)
Naftaleno	91-20-3	C ₁₀ H ₈	128.2	81	218	2.48 x 10 ⁻⁴	3.36	1.04 x 10 ⁻²
Acenaftileno	208-96-8	C ₁₂ H ₈	152.2	92	265 [8]	2.58 x 10 ⁻⁵ [8]	4.07	8.9 x 10 ⁻⁴
Acenafteno	83-32-9	C ₁₂ H ₁₀	154.2	95	279	2.55 x 10 ⁻⁵	3.92	2.9 x 10 ⁻⁴
Fluoreno	86-73-7	C ₁₃ H ₁₀	166.2	116	295	1.19 x 10 ⁻⁵	4.18	9.0 x 10 ⁻⁵
Fenantreno	85-01-8	C ₁₄ H ₁₀	178.2	100	340	7.24 x 10 ⁻⁶	4.57	1.6 x 10 ⁻⁵
Antraceno	120-12-7	C ₁₄ H ₁₀	178.2	216	342	4.10 x 10 ⁻⁷	4.54	8.0 x 10 ⁻⁷
Fluoranteno	206-44-0	C ₁₆ H ₁₀	202.3	109	375	1.29 x 10 ⁻⁶	5.22	1.2 x 10 ⁻⁶
Pireno	129-00-0	C ₁₆ H ₁₀	202.3	150	393	6.68 x 10 ⁻⁷	5.18	6.0 x 10 ⁻⁷
Benzo[a]antraceno	56-55-3	C ₁₈ H ₁₂	228.3	161	400	6.14 x 10 ⁻⁸	5.61	2.8x 10 ⁻⁸
Criseno	218-01-9	C ₁₈ H ₁₂	228.3	254	448	8.76 x 10 ⁻⁹	5.91	8.4 x 10 ⁻⁸
5-Metilcriseno	3697-24-3	C ₁₉ H ₁₄	242.3	117	458	3.02 x 10 ⁻⁸ [9]	6.42 [9]	---
Benzo[e]pireno	129-97-2	C ₂₀ H ₁₂	252.3	179	493	2.5 x 10 ⁻⁸ [8]	6.44	7.4 x 10 ⁻¹⁰
Benzo[b]fluoranteno	205-99-2	C ₂₀ H ₁₂	252.3	168	481	4.8 x 10 ⁻⁹	6.12	6.7 x 10 ^{-8 a}
Benzo[k]fluoranteno	207-08-9	C ₂₀ H ₁₂	252.3	216	480	3.01 x 10 ⁻⁹	6.84	1.3 x 10 ^{-11 a}
Benzo[a]pireno	50-32-8	C ₂₀ H ₁₂	252.3	178	496	1.51 x 10 ⁻⁸	6.50	7.3 x 10 ⁻¹⁰
Benzo[g,h,i]perileno	191-24-2	C ₂₂ H ₁₂	276.3	278	545	9.41 x 10 ⁻¹⁰	7.10	1.4 x 10 ⁻¹¹
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	193-39-5	C ₂₂ H ₁₂	276.3	164	536	2.25 x 10 ⁻⁷	6.58	1.3 x 10 ^{-11 a}
Dibenzo[a,h]antraceno	53-70-3	C ₂₂ H ₁₄	278.4	267	524	1.80 x 10 ⁻⁹ [8]	6.50	1.3 x 10 ^{-11 a}
Dibenzo[a,i]pireno	191-30-0	C ₂₄ H ₁₄	302.4	162	595	---	6.75 [10]	---

K_{ow}, coeficiente de partición octanol-agua; S, solubilidad en agua a 25 °C; Pv, presión de vapor a 25 °C

^(a) presión de vapor a 20 °C

1.2. ORIGEN Y FUENTES

1.2.1. FORMACIÓN DE PAHs

La **combustión** de hidrocarburos a temperaturas relativamente elevadas (superiores a 500 °C) y con insuficiente oxígeno para la combustión completa, son las condiciones propicias para la formación de PAHs. El proceso transcurre a través de la formación de radicales libres, producidos por ruptura de enlaces C-C y C-H, que reaccionan entre sí [6].

Las cantidades de PAHs formadas, dependen de la temperatura de combustión y de la naturaleza de la materia orgánica implicada en el proceso. En estas reacciones se forman también PAHs alquil sustituidos, y como regla general, una temperatura de combustión más elevada conduce a PAHs menos sustituidos. En la figura II.2, podemos ver un posible mecanismo de formación de PAHs en la combustión de ciertas materias orgánicas [6].

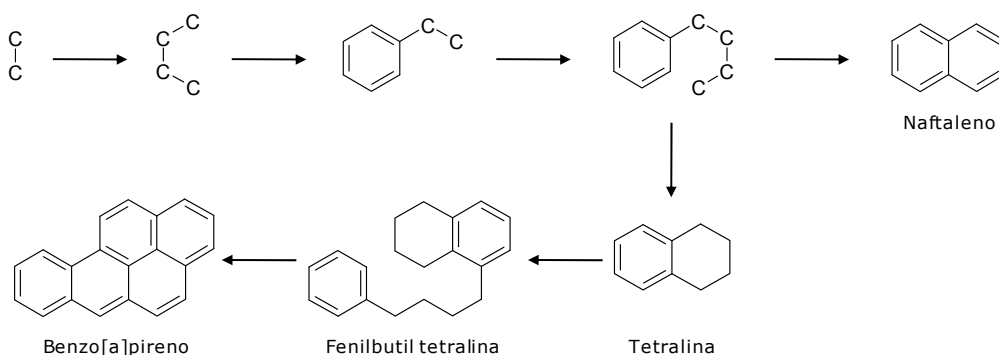


Figura II.2 Posible mecanismo de formación del Benzo[a]pireno.

La **formación geológica** de los combustibles fósiles también puede generar PAHs, aunque mediante procesos algo diferentes. El material biológico que da origen al carbón y petróleo, evoluciona en este caso bajo presión y a temperaturas relativamente bajas (menos de 200 °C), condiciones en las que pueden formarse ciertas cantidades de PAHs. De ahí que PAHs alquil sustituidos, se encuentren presentes en combustibles crudos y en materiales derivados de los mismos. La combustión de petróleo y carbón provoca la emisión de PAHs

1. PAHs

contenidos en esos combustibles y de nuevos PAHs que pueden producirse al quemarlos [3,6].

Otra posibilidad es la formación de PAHs mediante **síntesis biológica**, aunque esta vía de formación es claramente minoritaria cuando se compara con las anteriores.

1.2.2. FUENTES DE EMISIÓN DE PAHs AL MEDIO AMBIENTE

Los PAHs emitidos al medio ambiente, son originados a partir de fuentes naturales y antropogénicas, siendo estas últimas las que originan una mayor contribución de estos contaminantes [1,3,6,11,12]. Como resultado de la enorme cantidad de fuentes de emisión y de su fácil difusión, los PAHs se han convertido en compuestos tóxicos ubicuos en el medio ambiente. A continuación, se recogen de manera más detallada las principales fuentes de emisión, en función de su naturaleza.

1.2.2.1. Fuentes naturales

En la naturaleza, los PAHs pueden formarse a partir de tres vías fundamentales: (1) pirólisis de materiales orgánicos a alta temperatura; (2) diagénesis de material orgánico sedimentado a baja temperatura, para formar fuel fósil; y (3) biosíntesis directa mediante microorganismos y plantas [13]. Así, haciendo referencia a las fuentes naturales, se pueden destacar las filtraciones naturales de fuel fósil [14], los incendios forestales fortuitos, la actividad volcánica y la deposición atmosférica de contaminantes [3,15,16]. Además algunos PAHs pueden ser derivados de precursores biogénicos como pigmentos y esteroides [17,18], o productos de la biosíntesis de fitoplancton y bacterias [19].

Un número importante de PAHs se generan mediante precursores biogénicos, que son constituyentes comunes de la mayoría de las plantas superiores, a través de procesos diagenéticos. Algunos autores sugieren que los PAHs pueden ser sintetizados por algas unicelulares, plantas superiores o bacterias. Sin embargo, otros investigadores prefieren considerar que los organismos acumulan PAHs, en lugar de sintetizarlos [20]. Baumard y col. [21] han analizado sedimentos recogidos en diferentes puntos del oeste del **Mar Báltico**. Aunque la mayor parte de la contaminación se produce mediante procesos pirolíticos a alta

temperatura, también se identificaron PAHs de origen diagenético, en uno de los puntos estudiados. También se han estudiado los PAHs en sedimentos de lago y suelos cercanos, en dos regiones europeas de alta montaña (**Pirineos y Tatra**). Se encontraron mezclas similares de PAHs en todos los casos, que indicaban el predominio de productos de combustión transportados por el aire. Sin embargo, los sedimentos mostraron la formación de grandes cantidades de perileno mediante transformación diagenética en las secciones profundas [22].

También se han propuesto algunas fuentes cósmicas [23,24] de PAHs, como por ejemplo las chondritas carbónicas, que se originan en el cinturón de asteroides [25]. Parece ser que los PAHs presentes en las chondritas, son el producto de una síntesis a elevada temperatura. Otra teoría, propone que son el resultado de las alteraciones térmicas de compuestos alifáticos pre-existentes. De todos modos, las alteraciones térmicas requieren la presencia de fases minerales a baja temperatura, tales como la magnetita y/o filosilicatos hidratados, para su formación [26].

1.2.2.2. Fuentes antropogénicas

La actividad humana está estrechamente relacionada con la emisión de PAHs al medio ambiente, ya que las principales vías de contaminación son de origen antropogénico. Dentro de estas fuentes, se pueden establecer cuatro categorías principales, dentro de las cuales se engloban la mayoría de las fuentes de emisión; fuentes domésticas, móviles, industriales y agrícolas [11,27].

Emisiones domésticas

Las emisiones domésticas están fundamentalmente asociadas con la quema de carbón, aceite, gas, residuos u otras sustancias orgánicas [28]. Actividades domésticas que producen PAHs incluyen las calefacciones con madera o fuel fósil, el humo de tabaco, la incineración de residuos, el proceso de asado o ahumado de alimentos en prácticas de cocina, y el uso de motores de combustión internos [15,27,29,30].

Los **sistemas de calefacción**, como el uso de calderas, chimeneas, estufas y quemadores de aceite o gas, pueden incrementar las concentraciones de PAHs en

1. PAHs

el aire interior [29,30]. La combustión de biomasa en calderas utilizadas para calefacción doméstica, es una vía de emisión importante [31,32].

Esen y col. [33,34] han evaluado las concentraciones de PAHs en la atmósfera de una zona residencial de **Turquía** y encontraron niveles diez veces superiores durante el periodo invernal, debido principalmente a las emisiones a partir de las calefacciones. Un estudio realizado en **China**, demuestra que el uso de carbón bituminoso para el calentamiento de los hogares, origina elevadas concentraciones de PAHs [35].



Figura II.3
Emisión de PAHs
a través del
humo de tabaco

Varios estudios han identificado el **humo de tabaco** como una de las principales fuentes de PAHs en ambientes interiores [36-39]. Las concentraciones de B[a]P encontradas en hogares de personas que consumen tabaco son 10 veces superiores que las encontradas en las residencias de los no-fumadores [40]. Lu y col. [41] han encontrado que más del 80% de B[a]P presente en las viviendas de Hangzhou (China) es originado por el humo de tabaco. En un estudio realizado recientemente se han encontrado concentraciones totales de 18 PAHs entre 1.45 a $6.82 \mu\text{g m}^{-3}$ por gramo de tabaco [39]. Por otro lado, Mannino y col. [42] encontraron que los niveles de PAHs en el polvo doméstico eran entre 2 y 16 veces mayores en los hogares de fumadores.

El modo de **preparación de alimentos**, es otra de las fuentes que contribuye a la contaminación de ambientes interiores con PAHs [43-45]. Los niveles de PAHs dependen enormemente del método de preparación de los alimentos y del tipo de fuente de calor utilizada [46]. Los combustibles utilizados juegan también un papel fundamental en la emisión de estos contaminantes [47,48].

La OMS estimó que casi el 75% de la población en países como China, India, y el Sureste de Asia, y entre el 50-75% en Sur América y África, utilizan diariamente combustibles sólidos (madera, residuos agrícolas, estiércol seco de animales, etc.) para cocinar [49]. Este es un hecho de gran importancia, si consideramos que numerosos estudios han demostrado que las concentraciones de PAHs se incrementan enormemente durante la combustión de biomasa [50,51].

Chen y col. [52] han estudiado los niveles de PAHs en carne de pato, sometida a diferentes procesos de preparación. Las mayores concentraciones se encontraron cuando la carne se preparó a la parrilla con carbón vegetal, seguido por ahumado, asado y preparado al vapor. Perelló y col. [53] han evaluado los niveles de PAHs de diferentes productos alimenticios (sardinas, atún, merluza, filete de ternera, lomo de cerdo, pollo, cordero, judías verdes, patatas, arroz y aceite de oliva) antes y después de su preparación. En términos generales, las concentraciones más elevadas se encontraron en alimentos fritos, observándose valores especialmente elevados en pescados.

Fuentes móviles

Generalmente, cuando se habla de fuentes móviles, se hace referencia a la emisión de vehículos como aviones, embarcaciones, ferrocarriles, automóviles, autobuses, camiones, todoterrenos y maquinaria [11,54,55]. El **transporte terrestre** es, sin duda, una de las fuentes móviles más importantes. Numerosos estudios demuestran que las emisiones vehiculares representan una de las mayores vías de emisión de PAHs en áreas urbanas [56-60]. Tavares y col. [61] han medido las concentraciones de 10 PAHs en una estación central de autobuses en **Londrina** (Brasil), donde sólo circulan vehículos diesel. Las muestras fueron recogidas dentro de periodos de 24 horas durante 14 días consecutivos, y la concentración media de PAHs fue de 84.5 ng m^{-3} . Las concentraciones de PAHs fueron menores el domingo, debido principalmente a la reducción del tráfico de autobuses en la estación. Además de las emisiones asociadas a la combustión en los motores del tráfico vehicular, también se producen emisiones a partir de las pérdidas de aceite, del desgaste de los frenos, la abrasión de los neumáticos y del asfalto utilizado en las carreteras [60].

Barcos, aviones y trenes también contribuyen de manera importante a la emisión de PAHs. Kholer y Kunniger [62] han estimado que cada año se emiten alrededor de 139 toneladas de estos contaminantes a partir de la creosota asociada a la red de ferrocarril suíza. Chen y col. [63] caracterizaron las emisiones a partir de un motor de helicóptero y encontraron concentraciones hasta 52 veces superiores que las encontradas en emisiones de motores de automóviles y aviones. La combustión que tiene lugar en los reactores de aviones, también constituye una vía de contaminación. La distribución espacial de las concentraciones de B[a]P en el

1. PAHs

suelo, ha permitido demostrar que un aeródromo militar, donde habitualmente despegan aviones, constituye una fuente importante de PAHs en la zona [64].



Figura II.4 Fotografía de la playa de Ximprón (Lira, A Coruña) tras el derrame de fuel del Prestige en 2002.

Los barcos también constituyen una fuente importante de emisión [65]. Cooper [66] ha evaluado la emisión de un barco durante sus actividades habituales de carga y descarga. Las emisiones totales de PAHs oscilaron entre 0.15-2 mg kW h⁻¹, excepto para el barco que utiliza aceites residuales más pesados (9.5-11 mg kW h⁻¹) que genera una mayor contaminación. La limpieza de los tanques de los petroleros en alta mar también se considera un foco de contaminación, pero sin duda

uno de los problemas más importantes se centra en los **derrames de fuel** en las aguas [67-71].

Fuentes industriales

Entre las fuentes industriales más importantes, se incluyen la producción primaria de aluminio (en particular aquellas plantas que utilizan el proceso de Soderberg), la producción de coque (por ejemplo, como parte de la producción de hierro y acero), creosota y conservación de la madera, incineración de residuos, fabricación de cemento, industrias petroquímicas y relacionadas, industrias de betún y asfalto, fabricación de neumáticos de caucho, y producción comercial de calor y energía [27,30,72].

Chen y col. [73] estudiaron los PAHs generados durante el proceso de **pirólisis** de residuos de neumáticos en una planta del Sur de **Taiwan**. El contenido total medio de estos contaminantes fue de 77 µg g⁻¹, siendo el I[1,2,3-c,d]P, DB[a,h]A y B[a]P los compuestos mayoritarios.

En un estudio realizado sobre 105 suelos del Norte de **China**, se han encontrado concentraciones extraordinariamente elevadas de PAHs. La muestra de suelo más contaminada (40692 ng g⁻¹) fue recogida en una zona con gran actividad portuaria, donde se producen continuamente descargas de mineral, petróleo y carbón. A excepción de esta muestra, las mayores concentraciones de PAHs se

encontraron en suelos distribuidos alrededor de parques industriales (**industria química y petro-química**) [74].

Law y col. [75] evaluaron la contaminación de sedimentos, mejillones y crustáceos (langostas y cangrejos) a partir de una planta de **producción de gas**. El substrato recogido en el antiguo emplazamiento de la planta de producción de gas, presentaba unas concentraciones muy elevadas de PAHs ($458000 \mu\text{g kg}^{-1}$). Esta fuerte contaminación está directamente relacionada con el uso de carbón, alquitrán y productos de refinería durante la producción de gas. Las concentraciones totales de PAHs en mejillones y crustáceos variaron entre 4.9 y $6450 \mu\text{g kg}^{-1}$. Las menores concentraciones se encontraron en crustáceos, mientras que los mejillones mostraban una fuerte contaminación ($1260\text{-}6450 \mu\text{g kg}^{-1}$).

Otros estudios demostraron la contaminación a partir de refinerías de petróleo [76], de una fundición de aluminio (Söderberg) [77], de plantas de reciclaje de residuos plásticos [78], y de industrias de hierro y acero [79].

Fuentes Agrícolas

La **quema de biomasa** a cielo abierto, es una práctica tradicional muy común para la eliminación de residuos agrícolas y forestales (hojas, ramas, maleza, paja, etc.) y la preparación de los campos antes de una nueva cosecha. Sin embargo, además de causar la reducción de la humedad del suelo, el incremento de la erosión, la pérdida de nutrientes y la destrucción de la materia orgánica, este tipo de prácticas, son responsables de la emisión una gran cantidad de contaminantes. Así, la quema de desechos agrícolas, constituye una fuente importante de emisión de PAHs al medio ambiente [80-85].

Godoi y col. [86] estudiaron la emisión de PAHs durante la quema de caña de azúcar, y los niveles encontrados fueron similares a los encontrados en algunos centros urbanos. Jenkins y col. [87] estudiaron los factores de emisión para 19 PAHs mediante la quema de biomasa agrícola y forestal. Las emisiones variaron entre 5 y 683 mg kg^{-1} , dependiendo principalmente de las condiciones de quemado y en menor medida del tipo de material quemado.

Pereira Netto y col. [88] estudiaron suelos de un área agrícola, localizada en una región no-contaminada de **Brasil**, después de ser sometidos a la quema de

1. PAHs

la vegetación. Además de los 16 PAHs de la EPA, encontraron el 2-metilfenantreno, benzo[b]fluoreno, benzo[e]pireno, perileno y coroneno. La concentración suma de los 21 PAHs identificados fue 174.4 ng g^{-1} . Se confirma que estas prácticas agrícolas no solamente emiten PAHs a la atmósfera, sino que también contaminan el suelo, originando además un riesgo de contaminación de aguas y sedimentos, lo que implica un riesgo para el medio ambiente y para la vida.

1.3. DISTRIBUCIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE

Los PAHs son contaminantes **ubiguos** en el medio ambiente [1,3,30,89,90]. Su amplia distribución se debe en gran medida a las diversas fuentes de emisión de estos compuestos, así como al hecho de que pueden ser distribuidos durante largas distancias sin sufrir una degradación significativa. Así, se han encontrado concentraciones considerables de estos contaminantes en las áreas más remotas del planeta [91-93]. Por ejemplo, en el **Ártico Noruego** (Svalbard, Ny-Ålesund) se han detectado concentraciones importantes en sedimentos de lagos ($0.011\text{-}1.10 \text{ mg kg}^{-1}$, peso seco) y sedimentos de zonas costeras ($0.025\text{-}0.038 \text{ mg kg}^{-1}$, peso seco) [94]. Por otro lado, en la **Sabana Tropical de Brasil** (El Cerrado), las concentraciones encontradas en plantas y suelos oscilaron entre $0.25\text{-}0.67 \text{ mg kg}^{-1}$ y $0.21\text{-}0.29 \text{ mg kg}^{-1}$, respectivamente [95].

El transporte y distribución de los PAHs en el medio ambiente depende en gran medida de sus propiedades físico-químicas, tales como su baja solubilidad en agua, baja presión de vapor y elevados coeficientes de partición octanol-agua ($\log K_{ow}$) y carbón-agua ($\log K_{cw}$). Los PAHs son estables respecto a la hidrólisis y tampoco poseen grupos reactivos, lo que los convierte en contaminantes altamente persistentes. En base a sus bajas constantes de Henry, la volatilización desde la fase acuosa es un proceso poco común. Los elevados valores de $\log K_{cw}$ indican una fuerte adsorción a la materia orgánica de los suelos, así que la migración tampoco es un proceso habitual. Los elevados valores de K_{ow} indican alta bioacumulación. En general, son biodegradables bajo condiciones aeróbicas, pero la velocidad de biodegradación disminuye drásticamente a medida que se incrementa el número de anillos aromáticos en la molécula. Bajo condiciones anaeróbicas, la biodegradación parece ser muy lenta [7,27].

Los PAHs son emitidos principalmente a la **atmósfera**, donde pueden ser transportados en la fase vapor y adsorbidos en la materia particulada. La distribución entre aire y materia particulada bajo condiciones atmosféricas normales, depende de su lipofilia, presión de vapor y solubilidad acuosa de la sustancia. Generalmente, los compuestos más volátiles, con dos o tres anillos aromáticos, son emitidos a la fase gaseosa, mientras que entre el 80-100% de los PAHs con 5 o más anillos se encuentran asociados a partículas atmosféricas [27,96].

De especial interés son los aerosoles con diámetro igual o menor a 1 μm , así como la materia particulada con diámetro menor a 2.5 μm , ya que representan la fracción de partículas inhaladas en la región más profunda del tracto respiratorio, y a su vez es donde se concentra la mayor cantidad de PAHs debido, a la condensación de la fase gaseosa en las partículas más pequeñas, constituyendo un riesgo potencial para la salud [1,96,97].

Los niveles de PAHs en la atmósfera son muy variables, y dependen en gran medida de parámetros como el tipo de fuentes de emisión, las condiciones meteorológicas y la presencia de otros contaminantes atmosféricos (CO , NO_x , O_3) [1,96].

En un estudio realizado en **Alemania** entre los años 1990 y 1998 se observó que las concentraciones de benzo[a]pireno detectadas en lugares caracterizados por tráfico (1.8 ng m^{-3}), industrias (1.3 ng m^{-3}) o ambientes urbanos (1.3 ng m^{-3}), son significativamente mayores que las detectadas en zonas rurales (0.92 ng m^{-3}) [98]. Resultados similares se encontraron en el **Reino Unido**, donde se registraron niveles medios de benzo[a]pireno entre $1\text{-}4 \text{ ng m}^{-3}$ en zonas urbanas y 0.3 ng m^{-3} en zonas rurales. Los mayores niveles de benzo[a]pireno se registraron en invierno, debido principalmente a la combustión de fuel para calentamiento de los espacios domésticos [99]. En la tabla II.2 se recogen algunos ejemplos de los niveles de estos contaminantes en el aire de diferentes lugares.

En **ambientes interiores** también se han encontrado niveles considerables de PAHs. Como se ha mencionado en el apartado anterior, dedicado a las fuentes de emisión, existen numerosos procesos que aumentan los niveles de contaminación del aire de los hogares. En un estudio realizado en **China** (Hangzhou) se encontraron niveles entre 425 y 3620 ng m^{-3} en ambientes

1. PAHs

residenciales. Los mayores niveles de contaminación se registraron en viviendas de fumadores, más concretamente en las cocinas y durante el periodo invernal [100]. En **Suecia**, los hogares que utilizan la quema de madera como medio de calefacción doméstica, presentaron niveles medios de benzo[a]pireno (0.52 ng m^{-3}) cinco veces mayores que el umbral establecido en este país para este contaminante (0.1 ng m^{-3}) [32]. Por otra parte, los niveles encontrados en hogares rurales del norte de **India** durante la preparación de alimentos, oscilaron entre 7750 y 15770 ng m^{-3} , en función del tipo de fuel utilizado para cocinar [101].

Tabla II.2 Concentraciones atmosféricas (ng m^{-3}) de PAHs en diferentes lugares alrededor del mundo.

Procedencia	Periodo	Características	Concentración (ng m^{-3})	PAHs	Ref
Brasil (Río de Janeiro)	2006-2007	Industrial, tráfico	15.53	16	[102]
Canadá (Revelstoke, Yoho, Observation)	2003-2004	Montaña	0.016-1.03	4	[103]
China (Hong Kong)	1998-2005	Urbano	117-938	17	[104]
China (Donghe)	2007-2008	Rural	18.8-1703	16	[105]
España (Cataluña)	2008	Industrial	6.7-27.66	16	[106]
Filipinas (Valenzuela, Quezon, Parañaque)	2005	Urbano	41.53-170.03	13	[107]
Filipinas (Bulacan, Rizal, Laguna)	2005	Rural	41.42-153.24	13	[107]
India (Delhi)	2004	Industrial, tráfico	74.85 ± 38.22	16	[108]
Japón (Osaka)	2005-2006	Residencial, urbano	1.1-9.8	11	[109]
Malasia (Kuala Lumpur)	2001	Urbano	3.10 ± 2.92	13	[110]
Taiwán (Taichung)	2002	Urbano	1220 ± 520	21	[111]
Taiwán (Taichung)	2002	Rural	831 ± 427	21	[111]
Taiwán (Taichung)	2002	Industrial	1650 ± 1240	21	[111]
Turquía (Bursa)	2004-2005	Industrial	13-2027	15	[112]
Turquía (Izmir)	2004-2005	Industrial, invierno	10.2-71.9	17	[113]
Turquía (Bursa)	2004-2005	Industrial	456 ± 524	14	[114]
Vietnam (Ho Chi Minh)	2005-2006	Residencial, urbano	2.6-21	11	[109]

Los PAHs también están enormemente distribuidos a través de las **aguas** de la Tierra. Los ríos, lagos y mares recogen, desde tiempos inmemoriales, las basuras producidas por la actividad humana. El ciclo natural del agua tiene una gran capacidad de purificación, pero esta misma facilidad de regeneración del agua, y su aparente abundancia, hace que en ocasiones sea el vertedero habitual en el que se arrojan los residuos producidos por las actividades humanas.

La contaminación de aguas superficiales con PAHs tiene lugar principalmente a través de la deposición atmosférica, la escorrentía de tierras contaminadas, y la contaminación directa de ríos y lagos mediante efluentes municipales e industriales [1,115]. Los vertidos de crudo al medio marino implican una fuente importante de contaminación de costas y océanos [67-71,116].

Si bien es cierto que la solubilidad de los PAHs en agua es baja, el carácter hidrofóbico de estos contaminantes no ha impedido que estén presentes en todo tipo de aguas, tal y como puede observarse en los ejemplos recogidos en la tabla II.3.

Los PAHs se han detectado en bajos niveles de concentración en aguas subterráneas, embalses y aguas de bebida, exceptuando el caso de **Egipto** donde los niveles oscilan entre 0.7 y 1.2 ppb [117]. En cuanto al agua de lluvia, los mayores niveles se registraron en **China** (Guangzhou) [118]. Estas elevadas concentraciones se deben principalmente al rápido desarrollo de la ciudad en las dos últimas décadas y al gran número de habitantes (10 millones aprox.), estableciéndose como principales fuentes de contaminación la combustión de fuel fósil y biomasa.

En cuanto a la contaminación marina, hay que mencionar el estudio realizado en las **costas gallegas** a raíz del accidente del Prestige en noviembre del 2002. El primer muestreo se realizó en diciembre del 2002, justo después del derrame de crudo. Los niveles de contaminación más elevados se registraron en Costa da Morte, el área más afectada por el derrame de fuel, con valores entre 290 y 5800 ng L⁻¹ (suma de 25 PAHs) [119]. En las otras estaciones estudiadas, las concentraciones de PAHs variaron entre 250 y 520 ng L⁻¹, con un valor medio de 360 ng L⁻¹. En los siguientes muestreos (febrero y septiembre de 2003) los niveles oscilaron entre 350 y 580 ng L⁻¹.

Las concentraciones detectadas en aguas de río son muy variables, ya que dependen en gran medida del grado de industrialización y actividad humana en sus alrededores. Así, los ríos que fluyen a través de grandes ciudades y áreas altamente industrializadas presentan mayores niveles de contaminación. Las concentraciones de PAHs en los estuarios de algunos ríos también ofrecen información acerca del aporte de contaminantes desde tierra a los ríos.

1. PAHs

La contaminación de **sedimentos** con PAHs está estrechamente relacionada con la contaminación de aguas de río, lago, costas y océanos. La naturaleza hidrofóbica de estos contaminantes, favorece su distribución desde las aguas hacia las partículas de sedimentos, donde se adsorben fuertemente. Los niveles de PAHs encontrados en sedimentos marinos procedentes de la **Bahía de Guaratuba** (Brasil), oscilaron entre 0.0015-3.13 mg kg⁻¹ [120], mientras que los procedentes del **Golfo de Trieste** (Mar Adriático, Eslovenia) mostraron concentraciones entre 0.088-0.60 mg kg⁻¹ [121]. Las concentraciones detectadas en sedimentos procedentes del **Río Amarillo** (China) [122], de **Bahía de Cartagena** (Colombia) [123] y del **Río Nilo** (Egipto) [117] fueron del mismo orden. En la **Reserva Natural de Urdaibai** (País Vasco, España) las concentraciones suma de 16 PAHs en sedimentos oscilaron entre 0.0007-0.14 mg kg⁻¹ [124].

Tabla II.3 Rango de concentraciones (ng L⁻¹) encontradas muestras reales de agua de diferente naturaleza.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración (ng L ⁻¹)	PAHs	Ref
Agua de bebida	Egipto	703-1238	16	[117]
Agua de bebida	España (Galicia)	14	8	[125]
Agua de bebida	China (Henan)	15-844	16	[126]
Agua de canal	China (Hangzhou, Gran Canal)	1104-6100	10	[127]
Agua de embalse	España (Andalucía, La Breña)	15.25	7	[128]
Agua subterránea	India (Agra)	13.2-64.3	13	[129]
Agua de lluvia	China (Guangzhou)	1264-6614	14	[118]
Agua de lluvia	Francia (Estrasburgo y Erstein)	1.6-968.1	17	[130]
Agua de lluvia	Francia (Feucherolles)	31-105.1	15	[131]
Agua de lluvia	Italia (Lago Mayor)	102.9 ± 11	14	[132]
Agua de lluvia	Singapur	5-162	16	[133]
Agua de mar	Argentina (Estuario de Bahía Blanca)	n.d.-4847	17	[134]
Agua de mar	España (Galicia)	350-580	25	[119]
Agua de mar	Túnez (Costa Jarzouna-Bizerte)	170.2-836.9	17	[135]
Efluente (fábrica de cuero)	China (Shuitou)	1444.2	15	[136]
Efluente	China (Shuitou)	546.0	15	[136]
Efluente	España (Andalucía)	n.d.-7.91	7	[128]
Efluente	Italia (Venecia)	1104	16	[137]
Efluente	Jordania (Karak)	303-496	16	[138]
Efluente	Noruega	78-1030	16	[139]
Efluente (refinería de petróleo)	Túnez (Costa Jarzouna-Bizerte)	3596.8	17	[135]
Influente	Egipto	894-1980	16	[140]
Influente	España (Andalucía)	38-236	7	[128]
Influente	Italia (Venecia)	3558-4618	16	[137]
Influente	Jordania (Karak)	1168-1224	16	[138]
Influente	Noruega	220-1340	16	[139]
Lago	China (Lago Oeste)	989-4869	10	[127]
Lago	Hungría (Lago Balaton)	170-720	15	[141]
Lago	Italia (Lago Mayor)	3.42 ± 0.33	14	[132]
Río	Brasil	23.1-1900.2	15	[142]
Río (estuario)	California (Estuario de San Francisco)	7-120	25	[143]
Río	China (Río Qiantang)	2436-9663	10	[127]
Río (estuario)	China (Estuario del Río Daliao)	139.2-1717.9	16	[144]
Río	China (Beijing)	87-1890	16	[145]
Río	China (Río Aojiang)	910-1520	15	[136]
Río	China (Río Amarillo)	144.3-2361	16	[122]
Río	Corea (Río Han)	42-178	16	[146]
Río	Egipto (Río Nilo)	1112.7-4351.2	16	[117]
Río	Egipto (Rama Rosseta del Río Nilo)	242-732	16	[140]
Río	España (Río Guadajoz)	17.7	7	[128]
Río	España (Río Guadalquivir)	n.d	7	[128]
Río	Hungría (Rama Ráckevei-Soroksári del Río Danubio)	6.7-3026	15	[147]

1. PAHs

La contaminación de aguas y sedimentos juega un papel importante en la entrada de PAHs en algunas **especies acuáticas**. Los factores de bioconcentración de PAHs son diferentes en función del organismo del que se trate. Especies que presentan una menor capacidad metabólica hacia los PAHs, como algas, moluscos, mariscos y los invertebrados más primitivos (protozoos, poríferos y cnidarios), acumulan altas concentraciones de estos contaminantes. Los peces generalmente no acumulan concentraciones elevadas de PAHs, ya que presentan un sistema que les permite metabolizarlos y excretarlos por la bilis [7,14].

En un estudio realizado en las costas de **Japón**, se han analizado PAHs en sedimentos y vida marina, con el objetivo de examinar los perfiles de bioacumulación y la toxicidad de estos contaminantes. Las concentraciones más altas se encontraron en organismos inferiores, como cangrejos y lombrices de mar, mientras que no se detectaron en peces costeros. La mayor bioacumulación en lombrices y cangrejos podría ser debida a la ingesta directa de partículas y sedimentos que están contaminados con PAHs [148]. En la tabla II.4 se recogen algunos ejemplos de los niveles de concentración encontrados en diferentes especies acuáticas.

Tabla II.4 Concentraciones (ng g^{-1} , peso fresco) encontradas en especies acuáticas de diferentes localizaciones.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración (ng g^{-1})	PAHs	Ref
Almejas	España (Huelva)	40.4-52.3	16	[149]
Almejas	Japón (Mar Ariake)	6.3 ± 3.0	24	[148]
Alburno	Italia (Lago Iseo)	26.6	4	[150]
Anchoa	España (Cataluña)	6.80	16	[151]
Atún	España (Cataluña)	15.56	16	[53]
Besugo	España (Huelva)	65.7	16	[149]
Breca	China (Hong Kong)	12.3	16	[152]
Caballa	Portugal (Oporto)	3.34-5.03	16	[153]
Cabeza de serpiente moteada	India (Río Gomti)	12.85-34.89	16	[154]
Cangrejo	Egipto (Ismalia)	11.7	16	[155]
Cangrejo	Japón (Mar Ariake)	4.2 ± 1.4^a	24	[148]
Carpa	China (Río Yangtze)	0.00029-0.00744	16	[156]
Carpa	Italia (Lago Iseo)	64.8^a	4	[150]
Gambas	España (Cataluña)	15.88	16	[151]
Jurel	Portugal (Oporto)	0.73-4.80	16	[153]
Langostinos	España (Huelva)	8.22	16	[149]
Lenguado	España (Huelva)	71.4	16	[149]
Lubina	Portugal (Oporto)	11.63-17.04	16	[153]
Lucio	Italia (Lago Iseo)	25.0^a	4	[150]
Mejillón	Argentina (Estuario de Bahía Blanca)	$384-1597^a$	17	[134]
Mejillón	China (Hong Kong, Puerto Victoria)	$600.4-22858.6^a$	15	[157]
Mejillón	España (Cataluña)	22.44	16	[151]
Mejillón	Japón (Costa de Mikuni-cho)	20.0-30.3	7	[71]
Merluza	España (Cataluña)	6.06	16	[53]
Mújol	Egipto (Ismalia)	154.3	16	[155]
Ostras	España (Reserva Natural Urdaibai)	$300-1400^a$	16	[124]
Ostras	Japón (Mar Ariake)	6.3 ± 1.8	24	[148]
Percebe	Japón (Costa de Mikuni-cho)	5.3-17.0	7	[71]
Pejerrey argentino	Argentina (Estuario de Bahía Blanca)	1095^a	17	[134]
Salmón	Canadá (Vancouver)	3.3-39.8	20	[158]
Salmón	Estados Unidos (Alaska)			
Salmón	España (Cataluña)	5.95	16	[151]
Sardina	España (Cataluña)	17.22	16	[53]
Sardina	Portugal (Oporto)	3.64-6.60	16	[153]
Sepia	España (Huelva)	21.8	16	[149]
Verrugato croca	Estados Unidos (Costa Sureste)	196	23	[159]

^a Concentraciones en peso seco

Los peces y productos marinos, representan una parte importante de la dieta y por lo tanto una ruta de entrada de PAHs en el organismo humano. Sin embargo, no son los únicos **alimentos** en los que se han detectado estos contaminantes. Diferentes estudios han permitido poner de manifiesto las concentraciones de PAHs presentes en carne [53,155], vegetales [160,161], frutas [162], aceites [151,163] y cereales [151].

1. PAHs

La contaminación de los alimentos se produce bien por la absorción de PAHs desde ambientes contaminados o bien por la forma de preparación de los mismos, ya sea por el tratamiento térmico en la preparación y manufactura, por contaminación accidental durante el procesado, aditivos y procesos de cocinado [1].

El ahumado de los alimentos también constituye una fuente importante de contaminación, especialmente cuando el proceso se realiza en condiciones no controladas [164,165]. Por ejemplo, pescado ahumado, en un horno tradicional que utiliza madera presenta una concentración de benzo[a]pireno entorno a 50 ng g^{-1} (peso seco) [166]. Un estudio realizado en **Cataluña** (España) sobre la exposición dietética a estas sustancias, encontró que los alimentos con mayores niveles de PAHs totales eran la carne y productos cárnicos (25.56 ng g^{-1}), aceites y grasas (23.48 ng g^{-1}) y cereales (20.44 ng g^{-1}) [151].

Jánská y col. [162] realizaron una investigación para comprobar los niveles de contaminación de frutas y verduras en **Moravia** (República Checa). Los niveles medios de PAHs totales encontrados en frutas, fueron 9.30 ng g^{-1} en manzana, 6.82 ng g^{-1} en uva y 4.57 ng g^{-1} en albaricoque. En el caso de los vegetales, las mayores concentraciones se encontraron en repollo (13.14 ng g^{-1}) seguido de perejil (9.22 ng g^{-1}), coliflor (8.85 ng g^{-1}), tomate (7.53 ng g^{-1}) y pepino (5.48 ng g^{-1}). Rojo-Camargo y col. [161] han publicado resultados similares, con concentraciones medias de 9.50 ng g^{-1} en tomate, 4.05 ng g^{-1} en manzanas y 3.87 ng g^{-1} en uvas.

Además de estar relacionada con la contaminación de sedimentos y especies acuáticas, la contaminación del agua está directamente relacionada con la contaminación de **lodos de depuradora y suelos**.

Tal y como puede observarse en la tabla II.3, el agua de lluvia y las aguas residuales contienen cantidades relativamente elevadas de PAHs. Estas aguas fluyen a través de la red de alcantarillado hasta llegar a las plantas de tratamiento de aguas residuales. Una vez allí, la naturaleza lipofílica de estos contaminantes, origina que se adsorban casi en su totalidad ($<90\%$) a las partículas de los lodos [167]. Como consecuencia, las concentraciones de PAHs en lodos oscilan generalmente desde unos pocos microgramos hasta cientos de miligramos por kg de materia seca, en función del origen del agua residual y del nivel de mineralización de la materia orgánica [168,169].

En la tabla II.5 se presentan algunos ejemplos de las concentraciones encontradas en lodos de depuradoras de aguas residuales.

Tabla II.5 Concentraciones (mg kg^{-1} , peso seco) en lodos de depuradora de aguas residuales.

Procedencia	Origen	Concentración (mg kg^{-1})	PAHs	Ref
China (Wenzhou)	Influente fábrica de cuero	2.61	15	[136]
China (9 ciudades)	Urbano	1.4-33	16	[170]
China (Zhejiang)	Industrial	33.73-82.58	16	[171]
China (Beijing)	Urbano	2.47-25.92	16	[172]
China (Delta del río Yangtzé)	Doméstico e industrial	0.0167-15.49	16	[173]
Corea (Sur, Río Nakdong)	Industrial	1.2-44.9	16	[174]
España (Pamplona)	Urbano e industrial	128-482	37	[175]
España (Cataluña)	Doméstico, urbano e industrial	1.13-5.52	16	[169]
Portugal (Porto)				
España (Cataluña)	Urbano e industrial	0.03-7.35	9	[176]
España (Cádiz)	Doméstico e industrial	1.95-10.10	16	[177]
España (Madrid)	Urbano, rural e industrial	0.39-6.39	27	[178]
España (Sevilla)	Urbano	0.22-2.67	16	[179]
Francia (París)	Doméstico e industrial	14-31	16	[180]
Francia (Lorena)	Urbano e industrial	17-73	16	[181]
Italia (Venecia)	Industrial y municipal	1.44	16	[137]
Jordania (Karak)	Urbano e industrial	0.029-0.039	16	[138]
Kuwait	Doméstico	1.56-6.18	16	[182]
Polonia	Industrial y municipal	2.04-3.64	16	[183]
Polonia	Municipal	0.94-1.31	16	[184]
Reino Unido	Doméstico, urbano e industrial	67-370	24	[185]
Suiza	Doméstico e industrial	1.00-22.64	16	[186]

La mayoría de las plantas de tratamiento de aguas residuales reciben influentes urbanos y municipales, de origen doméstico e industrial. El origen de las aguas residuales determina la cantidad de contaminantes en el lodo resultante. Según Hua y col. [171] existe una importante relación entre la proporción de agua residual de origen industrial, recibida en las plantas de tratamiento de aguas residuales, y el contenido de PAHs en el lodo. Berset y col. [186] han encontrado que los niveles de PAHs en lodos de origen doméstico son menores que las concentraciones encontradas en lodos de origen industrial. Por su parte, Villar y col. [177] han encontrado que la concentración de PAHs en lodos es más alta en verano y otoño, lo que está asociado con el incremento estacional de la actividad industrial en la zona estudiada.

1. PAHs

El suelo parece ser un depósito importante de PAHs a largo plazo y se considera un indicador fiable del estado de contaminación ambiental. La acumulación de los PAHs en suelos podría originar la contaminación de vegetales y por lo tanto entrar en la cadena alimenticia, originando la exposición directa o indirecta a humanos.

Los PAHs son adsorbidos fuertemente a la fracción orgánica de los suelos. Algunos PAHs pueden ser degradados biológicamente en la capa aeróbica del suelo, pero este proceso es lento, debido a la adsorción a la fracción de carbón orgánico del suelo que reduce su biodisponibilidad [7].

Muchos estudios han publicado los niveles de contaminación de los suelos en diferentes regiones de la Tierra [20]. En la tabla II.6, se pueden observar algunos ejemplos.

Tabla II.6 Concentraciones (mg kg^{-1} , peso seco) de PAHs en suelos de diferentes lugares.

Tipo de matriz	Procedencia	Concentración (mg kg^{-1})	PAHs	Ref
Suelo contaminado (creosota)	Australia (Australia Meridional)	7767 \pm 1286	16	[187]
Suelo	Canadá (Revelstoke, Yoho, Observation)	0.002-0.79	16	[103]
Suelo	China (Wenzhou)	0.40-1.93	15	[136]
Suelo	China (Hangzhou)	0.060-0.62	10	[127]
Suelo urbano	China (Shangai)	0.44-19.70	22	[188]
Suelo	China (Wenling)	0.37-1.23	16	[189]
Suelo agrícola	China (Noreste)	0.6-12.36	16	[190]
Suelo	Corea del Sur	0.012-1.02	15	[146]
Suelo de marisma	Corea del Sur (Costa Sur y Oeste)	0.070-1.18	16	[191]
Suelo agrícola	Corea del Sur	0.023-2.83	16	[192]
Suelo urbano	Eslovenia (Ljubljana)	0.22-4.49	15	[193]
Suelo agrícola	España (Almería)	0.0015-0.37	18	[194]
Suelo	Estados Unidos (Texas)	0.0001-2.23	16	[195]
Suelo	India (Delhi)	1.06-9.65	16	[196]
Suelo	India (Delhi)	0.0024-0.0075	12	[197]
Suelo de jardín doméstico	Italia	0.040-5.28	13	[198]
Suelo urbano	Italia (Turín)	0.15-23.50	15	[193]
Suelo	Italia (Reserva Natural <i>Isola delle Femmine</i>)	0.035-0.55	16	[199]
Suelo	Japón	0.13	16	[200]
Suelo	Nigeria (Delta del Niger)	0.024-0.12	28	[201]
Suelo	Nigeria (Delta del Niger)	1.69 $\times 10^{-8}$ -0.37	16	[202]
Suelo contaminado (creosota)	Noruega (Drammen)	5550	15	[203]
Suelo urbano	Noruega (Drammen)	38.0	15	[203]
Suelo	Noruega	0.009-1.05	15	[204]
Suelo	Pakistán (Peshawar)	80.4-113	7	[205]
Suelo	Reino Unido	0.042-11.20	15	[204]
Suelo urbano	Reino Unido (Glasgow)	1.49-51.82	15	[193]
Suelo	Sudáfrica (Triángulo del Vaal)	0.20-38.85	16	[206]
Suelo	Suiza	0.032-8.47	16	[207]
Suelo industrial	Turquía (Aliaga)	0.0011-4.63	15	[113]

En un estudio realizado en **Delhi** (India) se investigó el impacto del tráfico vehicular en el estado de contaminación de los suelos [196]. Se analizaron suelos superficiales (0-5 cm) recogidos en zonas con tráfico, y un suelo de una zona rural. Las concentraciones totales de 16 PAHs en los lugares caracterizados por el tráfico oscilaron entre 1.06 y 9.65 mg kg^{-1} , con un valor medio de $4.69 \pm 3.03 \text{ mg kg}^{-1}$; mientras que la concentración media encontrada en el suelo rural fue de $0.886 \pm 0.303 \text{ mg kg}^{-1}$. Khan y col. [205] desarrollaron un estudio similar en **Peshawar** (Pakistán) y encontraron que los suelos cercanos a las carreteras presentaban un alto nivel de contaminación. Las concentraciones totales de 7 PAHs en suelos

1. PAHs

oscilaron entre 80.4 y 113 mg kg⁻¹, estableciéndose las emisiones vehiculares como principal fuente de contaminación.

Las actividades industriales también figuran como una fuente importante de contaminación. Así, las concentraciones suma de 15 PAHs en suelos recogidos de 50 puntos diferentes, en la región industrial de **Aliaga en Izmir** (Turquía), variaron entre 0.011 y 4.628 mg kg⁻¹. La distribución espacial de estas concentraciones indicó que en Aliaga, las plantas de acero, la refinería de petróleo y la planta petroquímica son las fuentes mayoritarias de PAHs en esta área [113].

De acuerdo con Vyskocil y col. [208] la concentración total de PAHs en suelos de un jardín infantil localizado en un área contaminada (0.132 mg kg⁻¹) fue el doble que aquellas encontradas en jardines infantiles situados en áreas no contaminadas (0.065 mg kg⁻¹).

1.4. TOXICIDAD

Los PAHs son contaminantes medioambientales que desatan un gran interés en el medio científico debido a su elevada toxicidad y su alto **potencial carcinogénico y mutagénico** [1,3,18,209-213]. La primera referencia histórica sobre la toxicidad de estos compuestos data de 1775, cuando el médico británico Percival Pott encontró cierta relación entre la profesión de deshollinador y el cáncer de escroto [214,215]. Dedujo que tras años y años de exposición al hollín, algunos trabajadores acababan por desarrollar este tumor maligno. Desde entonces, se ha realizado un gran esfuerzo investigador para poder establecer la relación entre estos compuestos y sus posibles efectos nocivos [216].

1.4.1. EVALUACIÓN MEDIOAMBIENTAL

En base a los efectos nocivos y la elevada toxicidad de estos contaminantes en los seres vivos y el medio ambiente, muchos compuestos de este grupo han sido considerados como contaminantes peligrosos por las asociaciones y organismos gubernamentales internacionales más relevantes.

Desde 1950 la **OMS** dio recomendaciones para el establecimiento de registros de cáncer epidemiológicos y en 1965 fundó la **Agencia Internacional de Investigación del Cáncer** (International Agency for Research on Cancer, IARC),

con centro en Lyon [217]. Este organismo realizó numerosas investigaciones y programas internacionales para llevar a cabo la identificación y evaluación de los riesgos asociados a la exposición de humanos a químicos carcinogénicos y mezclas complejas. El programa de monografías de la IARC ha evaluado el potencial carcinogénico de los PAHs y nitro-PAHs [218-220], así como los riesgos asociados a diferentes materiales y actividades relacionadas [221-224]. Por su parte, la OMS dedica una monografía [7] a los PAHs, en la cual se recogen las propiedades físico-químicas, las principales fuentes de emisión, la distribución de estos contaminantes en el medio ambiente, así como una descripción detallada de los efectos nocivos y la toxicidad de estos compuestos.

La IARC cataloga las sustancias según el conocimiento de su carcinogenia estableciendo varios grupos diferenciados [219,220]. En la tabla II.7 se recoge la clasificación que establece la IARC para diferentes PAHs y mezclas relacionadas.

Tabla II.7 Clasificación establecida por la IARC para algunos PAHs y mezclas de interés [220].

Grupo 1	Benzo[a]pireno, gasificación de carbón, producción de coque, destilación de alquitrán de carbón, deshollinador de chimeneas, pavimentado con alquitrán, producción de aluminio
Grupo 2A	Ciclopenta[c,d]pireno, dibenz[a,h]antraceno, dibenzo[a,l]pireno, creosota, manufactura de carbón mediante electrodos
Grupo 2B	Benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[c]fenantreno, criseno, dibenzo[a,h]pireno, dibenzo[a,i]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno, 5-metilcriseno
Grupo 3	Acenafteno, antraceno, benzo[b]criseno, benzo[g]criseno, benzo[a]fluoranteno, benzo[g,h,i]fluoranteno, benzo[a]fluoreno, benzo[b]fluoreno, benzo[c]fluoreno, benzo[g,h,i]perileno, benzo[e]pireno, coroneno, dibenz[a,c]antraceno, dibenzo[a,j]antraceno, dibenzo[a,e]fluorantano, dibenzo[def, mono]criseno, dibenzo[h,rst]pentafeno, dibenzo[a,e]pireno, dibenzo[e,l]pireno, 1,4-dimetilfenantreno, fluoranteno, fluoreno, 1-metilcriseno, 2-metilcriseno, 3-metilcriseno, 4-metilcriseno, 6-metilcriseno, 2-metilfluoranteno, 3-metilfluoranteno, 1-metilfenantreno, perileno, fenantreno, piceno, pireno, trifenileno.

Grupo 1, el compuesto es cancerígeno para los humanos. **Grupo 2A**, probablemente cancerígeno para los humanos. **Grupo 2B**, posiblemente cancerígeno para los humanos. **Grupo 3**, no clasificable como cancerígeno para los humanos.

La **EPA** ha elaborado varias publicaciones relativas a la toxicidad y los efectos dañinos de los PAHs. Además ha clasificado 16 PAHs como contaminantes orgánicos prioritarios [225,226]. Estos son el naftaleno, acenafteno, acenaftileno,

1. PAHs

fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,hi]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno. Por otro lado, ha clasificado el benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, criseno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno como probables carcinógenos [227], y reconoce como carcinógenos mezclas de compuestos como por ejemplo el hollín, las emisiones de hornos de coque y el alquitrán de carbón, que contienen PAH [228].

La **Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades** (Agency for Toxic Substances and Disease Registry, ATSDR) ha preparado un perfil toxicológico [8] que incluye información acerca de la toxicología y de los efectos adversos en la salud, y ha elaborado una lista de 17 compuestos del grupo de los PAHs, en base a su toxicidad, mayor riesgo de exposición, mayores concentraciones encontradas y el volumen de información existente sobre ellos. La mayoría de los compuestos recogidos coinciden con los clasificados por la EPA como contaminantes prioritarios, exceptuando el naftaleno e incluyendo el benzo[e]pireno y el benzo[j]fluoranteno.

Por otra parte, a lo largo de la década pasada, los PAHs se han situado en los primeros puestos de la lista de sustancias peligrosas de la **Ley de Responsabilidad, Compensación y Recuperación Ambiental** (Comprehensive Environmental Response Compensation, and Liability Act, CERCLA). Así, el benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno y el grupo de los PAHs en general, se han situado entre los diez primeros puestos de un total de 275 sustancias [229].

En base a que existen suficientes evidencias de carcinogénesis en animales, el **Programa Nacional de Toxicología** (NTP) anticipa que contaminantes como el benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[a,e]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, dibenzo[a,i]pireno, dibenzo[a,l]pireno, indeno[1,2,3-c,d]pireno y 5-metilcriseno, pueden ser considerados como carcinógenos en humanos [230].

1.4.2. TOXICOLOGÍA Y RIESGOS PARA LA SALUD

La genotoxicidad de los PAHs depende en gran medida de su estructura química, ya que ha sido asociada con el grado de no-planaridad de estos

compuestos, así como a la existencia de la "región bahía". El aumento de la reactividad en los PAHs no-planares se cree que es debido al aumento del carácter olefínico de algunos enlaces aromáticos en la molécula, mientras que la presencia de la "región bahía" le confiere a la molécula unas propiedades electrofílicas elevadas que permiten interaccionar con los enlaces covalentes [16,231]. La introducción de grupos metilo o de otro tipo en los anillos de estos compuestos produce una distorsión de la planaridad que algunas veces se traduce en mayor reactividad y carcinogenicidad. Entre los más peligrosos destacan los derivados del antraceno, molécula que curiosamente ella misma no es carcinogénica, pero sí las que contienen su estructura básica a la que se añade algún anillo bencénico (como benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno) y algunos sustituyentes como los grupo metilo. También es importante destacar que aunque algunos PAHs carecen de propiedades mutágenas y cancerígenas, tienen una función de co-cancerígenos cuando se aplican simultáneamente con sus homólogos cancerígenos [232].

La actividad genotóxica de los PAHs ha sido evaluada mediante estudios con diferentes animales [209], como por ejemplo mejillones expuestos al fuel derramado por el Prestige [70], roedores salvajes de un área de minería de hulla [233] o caracoles expuestos a materia particulada con concentraciones importantes de PAHs [234]. En todos los casos se han detectado daños serios en el ADN. Chakravarti y col. [235] han estudiado la formación de aductos estables de PAHs y ADN en piel de ratones y han observado que son responsables de mutaciones que dan lugar a papilomas y tumores.

Los PAHs se bioacumulan en los tejidos grasos de algunos organismos marinos, relacionándose con la producción de lesiones de hígado y tumores en algunos peces [3], así como se piensa que juegan un papel importante en la devastación de las poblaciones de ballenas beluga en el río St. Lawrence [4,236]. Generalmente la exposición a niveles subletales de PAHs en el rango lipofílico de log K_{ow} de 2 a 6, origina anomalías morfológicas, fisiológicas y del desarrollo en pescados. Además se ha demostrado que la exposición a PAHs causa una importante reducción en la incubación de huevos y en la longitud y el peso de las larvas, así como aberraciones en cromosomas de pescado [3].

1. PAHs

La relación entre PAHs y cáncer en los seres humanos, ha sido determinada a través de numerosos estudios epidemiológicos [237-247]. La absorción tiene lugar principalmente por inhalación, ingestión y en menor medida por vía cutánea.

Evidencias experimentales sugieren que la exposición de los padres a PAHs, principalmente a través del humo de tabaco, la actividad laboral y la contaminación del aire, podría incrementar el riesgo de cáncer durante la infancia [248-250]. También se ha demostrado la habilidad de los PAHs carcinógenos del tabaco para dañar el ADN, formando aductos **PAH-ADN**, relacionados con el cáncer de pulmón [251], cervical [252] y de mama [242].

El ritmo de cáncer de pulmón en las mujeres chinas es mayor que en los hombres, posiblemente debido a las mayores exposiciones a los PAHs procedentes de la quema de carbón y de los humos del aceite cocinado [4]. La quema de carbón bituminoso para la cocina y el calentamiento de hogares en diferentes regiones de China, ha originado que las concentraciones de PAHs en los ambientes interiores sean muy superiores que las encontradas en ambientes exteriores. Este hecho ha sido directamente asociado a la mayor incidencia de cáncer de pulmón en estas regiones [35].

El riesgo asociado a la exposición ocupacional también ha sido evaluado a través de numerosos estudios [253-255]. Así se ha relacionado el riesgo de cáncer de pulmón con la exposición a PAHs mediante inhalación en hornos de coque, fabricación de gas o en la producción de aluminio [256]. También se ha observado una mayor incidencia de tumores de esófago, vejiga y pulmón en deshollinadores de chimeneas [257].

Además de su actividad carcinogénica, hay que destacar que los PAHs pueden actuar como disruptores endocrinos, originando efectos adversos en la reproducción [258,259], como por ejemplo anovulación, reducción de la velocidad de concepción, abortos, desórdenes menstruales y defectos en el desarrollo de los tejidos reproductivos femeninos [260] así como la disminución de la fertilidad en varones [261-264]. Por otro lado, diversos estudios han demostrado que la exposición a PAHs durante la etapa de gestación, origina problemas en el desarrollo normal del feto, incluso provocando posteriormente problemas de salud en los niños [265-268].

Otros riesgos asociados a la exposición a PAHs son efectos agudos y crónicos en el sistema nervioso central, pérdida de consciencia, depresión respiratoria, alteraciones de la función intelectual y problemas cardiovasculares [258,269].

1.4.3. METABOLISMO

En las últimas décadas se ha establecido un progreso significativo en el estudio de la acción biológica y destino en el organismo de los PAHs. Se han realizado numerosos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, para investigar el mecanismo responsable del efecto mutagénico y carcinogénico de los PAHs [16, 235, 270-278]. Se ha comprobado que las moléculas de PAHs no son por sí mismas agentes cancerígenos, sino que ejercen su actividad carcinogénica y mutagénica a través de la **biotransformación** a compuestos intermedios químicamente reactivos, que se enlazan covalentemente a macromoléculas celulares [210,258].

La capacidad de metabolización de los PAHs está ampliamente distribuida en el reino animal pero suele ser mayor entre los organismos superiores. Una vez incorporados al organismo experimentan una oxidación enzimática, llevada a cabo por el sistema de oxidasas de función mixta (MFO), ubicado mayoritariamente en el hígado, que los convierte en epóxidos y en dihidrodioles. Estas especies químicas constituyen la forma genotóxicamente activa de los PAHs, las cuales pueden formar aductos covalentes con proteínas y ácidos nucleicos celulares. Los aductos con ADN pueden entonces dar lugar a una mutación genética, de potenciales consecuencias tumorígenas malignas para el individuo expuesto, sin olvidar los riesgos de malformaciones que suponen para embriones y fetos. En consecuencia, los PAHs son promutágenos que precisan de la activación metabólica para poder ejercer sus acciones sobre el material genético [3,4,27,209,231,232].

Los PAHs son sustancias poco solubles, por lo que el organismo los transforma en derivados hidrosolubles, que en caso de estos compuestos están constituidos por los óxidos de areno correspondientes, los cuales, en presencia de agua se hidratan dando lugar a dioles, sustancias que se excretan más fácilmente. No obstante, algunos de estos dioles sufren una segunda epoxidación dando lugar a diol-epóxidos. La biotransformación de los PAHs a moléculas diol-epóxido es realizada por el CYP1A1. Estos metabolitos diol-epóxidos forman enlaces covalentes con una guanina del ADN y son los agentes cancerígenos responsables de inducir

1. PAHs

cambios estructurales y roturas en el ADN, al tiempo que bloquean la actividad de los sistemas enzimáticos de reparación y/o provocan errores en su replicación. En presencia del ADN, el grupo $-NH_2$ de la base nitrogenada de éste produce un ataque nucleofílico sobre el epóxido. La unión de este hidrocarburo a la base nitrogenada, impide que ésta se acople adecuadamente a la doble hélice del ADN, impidiendo el establecimiento de puentes de hidrógeno con la base nitrogenada conjugada de la hebra opuesta, lo cual dará lugar a mutaciones [215,231,273,279]. En la figura II.5 se muestra el proceso de mutagénesis del ADN por los derivados del benzo[a]pireno.

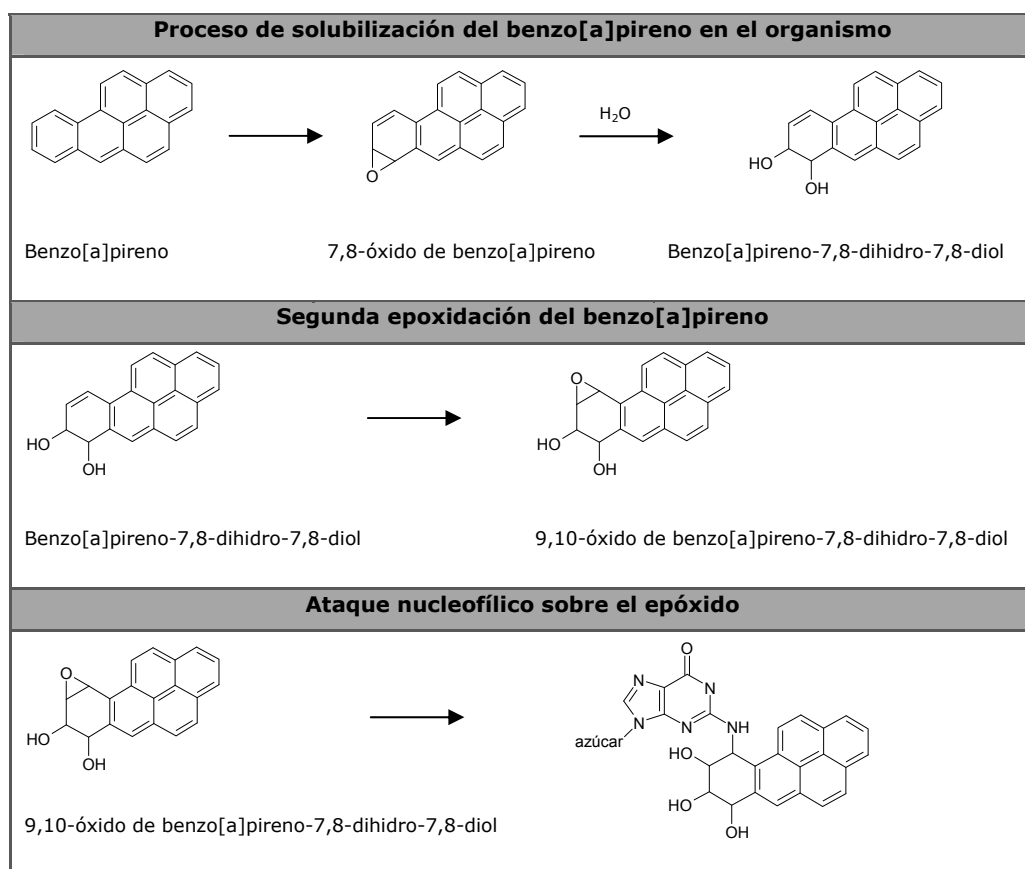


Figura II.5 Proceso de mutagénesis del ADN por el benzo[a]pireno.

1.5. LEGISLACIÓN

La naturaleza tóxica de algunos PAHs y la amplia distribución de estos contaminantes en el medio ambiente, han garantizado su inclusión en la legislación

de control medioambiental. Así, se han establecido límites para ciertos PAHs en diferentes matrices.

En **aguas de bebida**, la EPA [280] y la OMS [281] recomiendan la monitorización de rutina del benzo[a]pireno. De acuerdo con la EPA, su concentración máxima no debería exceder de 200 ng L^{-1} , mientras que la OMS ha establecido la concentración máxima permisible de benzo[a]pireno de 700 ng L^{-1} . La Unión Europea (European Union, EU), en su Directiva del 98/83/EC ha regulado además del benzo[a]pireno, el benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno [282]. Los valores máximos de estos contaminantes han sido situados en 10 ng L^{-1} para el benzo[a]pireno y 100 ng L^{-1} para la suma de los PAHs restantes.

La EU también ha establecido unos límites muy restrictivos para estos compuestos en diferentes tipos de **aguas superficiales** [283]. En la tabla II.8 se pueden observar los límites recogidos para los PAHs.

Tabla II.8 Estándares de control de calidad para PAHs en aguas superficiales.

Compuesto	AA-EQS aguas continentales superficiales	AA-EQS otras aguas superficiales	MAC-EQS aguas continentales superficiales	MAC-EQS otras aguas superficiales
Antraceno	0.1	0.1	0.4	0.4
Fluoranteno	0.1	0.1	1	1
Naftaleno	2.4	1.2	No aplicable	No aplicable
Benzo[a]pireno	0.05	0.05	0.1	0.1
Benzo[b]fluoranteno	$\Sigma=0.03$	$\Sigma=0.03$	No aplicable	No aplicable
Benzo[k]fluoranteno				
Benzo[g,h,i]perileno	$\Sigma=0.002$	$\Sigma=0.002$	No aplicable	No aplicable
Indeno[1,2,3-c,d]pireno				

Unidades, $\mu\text{g L}^{-1}$; AA-EQS, Estándar de calidad medioambiental expresada como un valor medio anual; MAC-EQS, Estándar de calidad medioambiental expresada como una concentración máxima permitida. En MAC-EQS donde aparece no aplicable, los valores de AA-EQS son de protección contra picos de contaminación a corto plazo ya que estos valores son significativamente menores que los valores derivados de la base de su toxicidad aguda.

Actualmente, los límites máximos para PAHs en **alimentos** están establecidos por el Reglamento 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006, por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios [284]. Los límites máximos establecidos en este reglamento

1. PAHs

se expresan en $\mu\text{g/kg}$ de benzo[a]pireno. Los alimentos a los que aplican estos límites máximos son aquellos que contienen grasas y aceites y alimentos donde el humo y los procesos de secado o la contaminación ambiental puedan causar altos niveles de PAHs. En la tabla II.9 se recogen los niveles máximos de PAHs permitidos en diversos alimentos, según el Reglamento (CE) nº 1881/2006.

Tabla II.9 Contenidos máximos de benzo[a]pireno en diferentes productos alimenticios.

Productos alimenticios	Contenido máximo de benzo[a]pireno ($\mu\text{g kg}^{-1}$, peso fresco)
Aceites y grasas (excluida la manteca de cacao) destinados al consumo humano directo o a ser usados como ingredientes de los productos alimenticios	2.0
Carnes ahumadas y productos cárnicos ahumados	5.0
Carne de pescado ahumado y productos pesqueros ahumados, excluidos los moluscos bivalvos. El contenido máximo se aplica a los crustáceos ahumados, excluida la carne oscura del cangrejo, así como la cabeza y el tórax de la langosta y de crustáceos similares de gran tamaño (<i>Nephropidae</i> y <i>Palinuridae</i>)	5.0
Carne de pescado, no ahumada	2.0
Crustáceos y cefalópodos, no ahumados. El contenido máximo se aplica a los crustáceos, excluida la carne oscura del cangrejo, así como la cabeza y el tórax de la langosta y de crustáceos similares de gran tamaño (<i>Nephropidae</i> y <i>Palinuridae</i>)	5.0
Moluscos bivalvos	10.0
Alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad	1.0
Preparados para lactantes y preparados de continuación, incluidas la leche para lactantes y la leche de continuación	1.0
Alimentos dietéticos destinados a usos médicos especiales dirigidos específicamente a los lactantes	1.0

Las referencias legales existentes en España acerca de PAHs en alimentos son muy limitadas. En el BOE Nº 178 se publica la Orden del 25 de julio de 2001, por la que se establecen límites de determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de orujo de oliva [285]. El límite máximo tolerable para el benzo[a]pireno, benzo[e]pireno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-

c,d]pireno será menor o igual a $2 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de aceite. La suma total de los posibles analitos cuantificados no superará una suma de $5 \mu\text{g Kg}^{-1}$ de aceite.

Por otro lado, después del accidente del Prestige, el gobierno español estableció niveles regulatorios que afectan a seis PAHs en **pescados y mariscos**, basados en los mismos niveles establecidos por el gobierno francés tras el accidente del Erika [286,287]. Estos niveles (en peso seco) son 20 ng g^{-1} para benzo[a]antraceno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno en muestras de pescado y 200 ng g^{-1} para crustáceos, cefalópodos y moluscos.

La presencia de PAHs en **lodos** residuales ha despertado recientemente un gran interés, y como resultado se han establecido concentraciones máximas aceptables para algunos PAHs en lodos que van a ser utilizados en agricultura. La EU, en su directiva del 2000, estableció que el valor límite es 6 mg kg^{-1} (peso seco) para la suma del acenafteno, fenantreno, fluoreno, fluoranteno, pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[j]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno [288]. Los niveles máximos permitidos en las regulaciones de USA es 4.6 mg Kg^{-1} (peso seco), calculados como la suma de benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e indeno[1,2,3-c,d]pireno, aunque la concentración máxima para el benzo[a]pireno es 1.0 mg kg^{-1} [177]. En Francia, la regulación del 8 de Enero de 1998, indica el límite máximo aceptable para tres PAHs; fluoranteno (5 mg Kg^{-1} , peso seco), benzo[b]fluoranteno (2.5 mg Kg^{-1} , peso seco) y benzo[a]pireno (2.0 mg kg^{-1} , peso seco) [289]. De igual manera, concentraciones máximas permitidas de 3.0 mg Kg^{-1} (peso seco) fueron establecidas en Suecia en 1996 para seis PAHs (fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-c,d]pireno) en lodos utilizados para fines agrícolas [290].

El **suelo** constituye uno de los medios receptores de la contaminación más sensibles y vulnerables. Sin embargo, a pesar de la evidente vulnerabilidad ecológica de los suelos, la legislación europea y la española han carecido de instrumentos normativos para promover su protección, y hasta la promulgación de la Ley 10/1998, del 21 de abril, de Residuos, en España no se disponía de ninguna norma legal que permitiera proteger eficazmente los suelos contra la contaminación

1. PAHs

y, en el caso de los ya contaminados, identificarlos y caracterizarlos utilizando para ello una metodología normalizada y técnicamente rigurosa.

En el 2005, mediante el Real Decreto 9/2005, del 14 de enero, se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados [291]. Así, el Gobierno de España ha establecido niveles regulatorios para algunos PAHs en función de los usos del suelo, estableciendo límites máximos aceptables para 13 PAHs (naftaleno, 1 mg Kg⁻¹; acenafteno, 6 mg Kg⁻¹; fluoreno, 5 mg Kg⁻¹; antraceno, 45 mg Kg⁻¹; fluoranteno, 8 mg Kg⁻¹; pireno, 6 mg Kg⁻¹; benzo[a]antraceno, 0.2 mg Kg⁻¹; criseno, 20 mg Kg⁻¹; benzo[b]fluoranteno, 0.2 mg Kg⁻¹; benzo[k]fluoranteno, 2 mg Kg⁻¹; benzo[a]pireno, 0.02 mg Kg⁻¹; dibenzo[a,h]antraceno, 0.03 mg Kg⁻¹; indeno[1,2,3-c,d]pireno, 0.3 mg Kg⁻¹ (*concentraciones en peso seco*)) en suelos destinados para actividades agrícolas, forestales y/o ganaderas.

Las regulaciones españolas están orientadas en línea con la política de sustancias químicas de la EU. Obviamente, algunos aspectos de la regulación están enfocados específicamente a la situación española, como la distribución entre los poderes del gobierno nacional o de los gobiernos locales. Sin embargo, una parte importante de la propuesta está basada en los protocolos europeos de evaluación de riesgo, y por lo tanto, puede ser extrapolada a nivel europeo [292].

La Directiva 96/62/CE de la EU sobre la evaluación y gestión de la calidad del **aire ambiente**, establece una lista de los contaminantes atmosféricos que deben tenerse en cuenta en la evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, donde aparecen los PAHs [293]. Más adelante, con el fin de reducir al mínimo los efectos perjudiciales para la salud humana, la Directiva 2004/107/CE estableció un límite máximo de 1 ng m⁻³ para el benzo[a]pireno, siendo este compuesto el indicador del riesgo cancerígeno de los PAHs en el aire ambiente [294].

Finalmente hay que mencionar que en España se han considerado los riesgos asociados a la **exposición laboral**. El Real Decreto 665/1997 del 12 de Mayo sobre la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos durante el trabajo, establece una serie de normas y medidas de seguridad e higiene para prevenir la exposición laboral de los trabajadores a una serie de sustancias entre las cuales figuran los hidrocarburos aromáticos policíclicos presentes en el hollín, alquitrán o la brea de hulla [295].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

A pesar de los considerables avances tecnológicos en el campo analítico, la mayoría de los instrumentos no pueden procesar matrices complejas directamente. En la mayoría de los casos se requiere una etapa previa de preparación de muestra, mediante la cual se concentran los analitos de interés, y se obtiene un extracto limpio, compatible con el sistema analítico. En ocasiones, si la muestra es muy compleja, los extractos resultantes de la etapa de preparación de muestra, requieren un protocolo de limpieza adicional, antes de su análisis. Así, generalmente las metodologías se componen de tres partes claramente diferenciadas, preparación de muestra, purificación de extractos y determinación.

En este **capítulo II.2** se recogen los métodos de preparación de muestra, purificación de extractos y determinación, utilizados en el análisis de PAHs. Dentro de los métodos de preparación, se establece una diferenciación en base a la naturaleza de la muestra. En un primer **capítulo II.2.1**, se describen los fundamentos y aspectos generales, de algunas de las metodologías más relevantes para la preparación de muestras acuosas. Posteriormente en el **capítulo II.2.2** se recogen los principales métodos de preparación de muestras sólidas. En ambos casos, se ofrece una explicación más pormenorizada de aquellas metodologías que se han utilizado en esta Tesis Doctoral. A continuación, se presentan los métodos de purificación más comunes (**capítulo II.2.3**) y finalmente en el **capítulo II.2.4** se describen los métodos de determinación.

2.1. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS ACUOSAS

2.1.1. TÉCNICAS TRADICIONALES

2.1.1.1. Extracción líquido-líquido

La **extracción líquido-líquido** (liquid liquid extraction, LLE), basada en la transferencia de los analitos desde la muestra acuosa hacia un disolvente inmiscible en agua, es una técnica empleada habitualmente para la preparación de muestras acuosas.

Por sus características, es una técnica especialmente apropiada para la extracción de PAHs, ya que son compuestos con un marcado carácter hidrofóbico y la extracción con un disolvente apolar resulta especialmente eficaz. De ahí, que la técnica haya sido aplicada para la extracción de estos compuestos de diferentes tipos de aguas medioambientales, como río [142], lluvia [296], lago [297] y agua de mar [298].

Los disolventes más utilizados para la extracción de PAHs son hexano [298,299], diclorometano [300-302] o mezclas de ambos [303]. De hecho, el diclorometano, es el disolvente utilizado en el método oficial EPA 550 [304], para la determinación de PAHs en aguas destinadas a consumo humano, y en el método EPA 610 [305], para la determinación de PAHs en aguas residuales.

No obstante, LLE presenta ciertos inconvenientes, ya que se trata de una técnica lenta y laboriosa, con elevado consumo de disolventes, y con problemas adicionales, como la formación de emulsiones y/o la necesidad de etapas adicionales de evaporación de disolvente.

2.1.1.2. Extracción en fase sólida

Otro método de preparación de muestra muy popular es la **extracción en fase sólida** (solid-phase extraction, SPE). Es una técnica de preparación y tratamiento de muestras, que está basada en la retención selectiva de los analitos sobre un adsorbente apropiado y en su posterior elución. Se trata de un proceso físico, en el que están implicadas, una fase sólida y un líquido. Los analitos presentan mayor atracción por la fase sólida, que por la matriz líquida de la

muestra. Como la muestra pasa a través del lecho del adsorbente, los analitos se concentran en la superficie, mientras que otros componentes de la muestra no retenidos, pasan a través del mismo. Seleccionando adsorbentes adecuados se pueden conseguir extracciones muy selectivas.

Esta técnica se ha aplicado en la extracción de PAHs de aguas de bebida [306,307], medioambientales [130,141,302] y residuales [137]. El C_{18} [126,308-311] es, con diferencia, la fase más utilizada, pero también se han descrito algunas aplicaciones con fases como C_8 [312,313], ciclohexil [141], o fases poliméricas, como discos de estireno-divinilbenceno [314], Oasis HLB (*polímero macroporoso de poli(divinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona)*) [130] o Strata-X (*fase polimérica de estireno-divinilbenceno de superficie modificada*) [315,316]. Los disolventes de elución más comunes son el acetonitrilo [302,312], metanol [317], 2-propanol [318], n-hexano [306,319], diclorometano [141,320], acetato de etilo [309,316], tetrahidrofurano [313], tolueno [307], o mezclas de ellos [130,137,315].

Aunque esta técnica utiliza menos volumen de disolvente que LLE, la cantidad del mismo puede considerarse bastante importante, y normalmente se requieren pasos adicionales de concentración de los extractos. Por otro lado, aunque la SPE puede ser automatizada, esto conlleva un aumento en la complejidad y un coste adicional.

En el caso concreto de los PAHs existen a mayores algunos inconvenientes, ya que es frecuente la pérdida de analitos debida a la adsorción de los mismos a las paredes de los recipientes y conductos por los que circula la muestra [320]. Este problema suele resolverse mediante la adición de un disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo o 2-propanol) o un surfactante, que incrementan la solubilidad de los analitos en la muestra acuosa. Sin embargo, la concentración del disolvente orgánico, es un parámetro crítico en SPE. Si el porcentaje de disolvente añadido es bajo, probablemente no sea suficiente para solubilizar los PAHs de mayor peso molecular, produciéndose de igual manera las pérdidas por adsorción. Si por el contrario el porcentaje de disolvente orgánico es demasiado elevado, el volumen de ruptura de los PAHs de bajo peso molecular, se verá reducido. Por lo tanto, se trata de un parámetro a tener en cuenta, que debe optimizarse en función del adsorbente y del disolvente utilizado [321]. Por otro lado, al tratar de conseguir un factor de concentración máximo, la eficiencia de la extracción disminuye de forma considerable para los PAHs más ligeros, que son menos retenidos por la fase

adsorbente, y que presentan un volumen de ruptura menor. Otro problema asociado que limita la recuperación de los compuestos más ligeros, es la pérdida por volatilidad durante las etapas de secado del cartucho y de concentración de los extractos.

Cabe mencionar en este sentido, que con el método oficial 550.1 descrito por la EPA, donde se utiliza SPE para la extracción de PAHs en aguas destinadas a consumo, mediante cartuchos de C_{18} o discos del mismo material, las recuperaciones para algunos de estos compuestos, son de un 50% aproximadamente [322].

2.1.2. TÉCNICAS DE MICROEXTRACCIÓN

La etapa de preparación de muestra está en continua evolución ya que es la causa más frecuente de pérdida de analitos y contaminaciones, y además origina un elevado consumo de tiempo, muestra y reactivos, en algunos casos caros y/o tóxicos. Por ello, la tendencia actual es eliminar todos o parte de estos problemas, o al menos reducirlos, mediante el desarrollo de nuevas técnicas de preparación de muestra o la modificación de las ya existentes, para hacerlas más rápidas, potentes y versátiles.

La **miniaturización** se ha convertido en una tendencia dominante en la Química Analítica durante los últimos años, ya que presenta numerosas ventajas frente a las técnicas de preparación de muestra tradicionales. Algunas de ellas son la simplicidad, rapidez, economía, minimización de las etapas y de la manipulación de la muestra, mayor precisión y sensibilidad. Además, se minimiza la cantidad de muestra, el consumo de reactivos, y de disolventes caros y tóxicos, obteniéndose un sistema más ecológico [323-325].

En las últimas décadas, las técnicas de microextracción están jugando un papel importante en la determinación de PAHs, ya que cada vez son más las metodologías descritas para la extracción de estos analitos mediante técnicas como la microextracción en fase sólida (SPME), la extracción con barras agitadoras (SBSE), la microextracción en fase líquida (LPME), etc. En la figura II.6, se presenta un esquema, donde se recogen las principales técnicas de microextracción que han sido aplicadas para la determinación de estos compuestos, y posteriormente se hace una breve descripción de cada una de las técnicas.

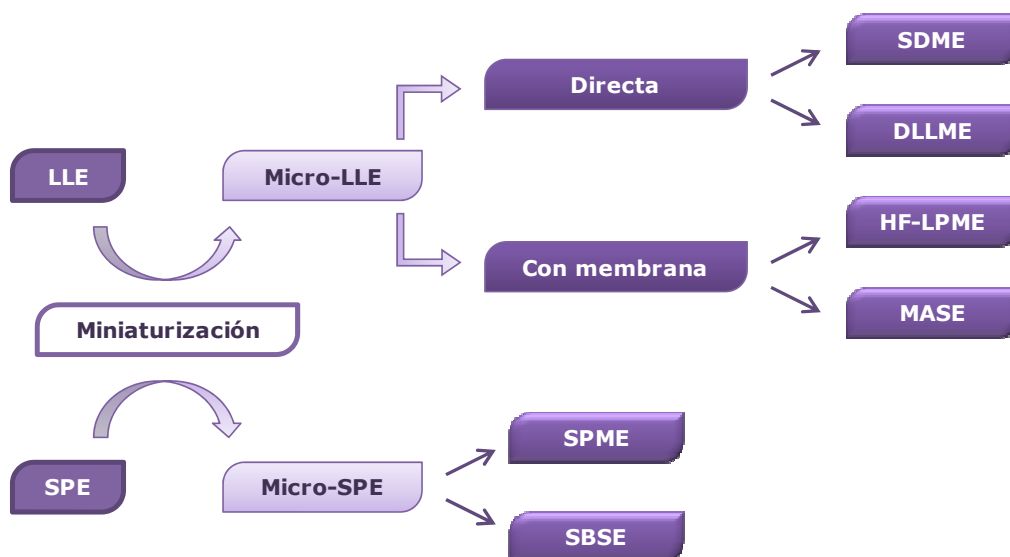


Figura II.6 Esquema de las técnicas de microextracción consideradas en este capítulo.

2.1.2.1. Microextracción con gota suspendida

La **microextracción con gota suspendida** (single drop microextraction, SDME) fue desarrollada en la década de los 90, como un procedimiento de pretratamiento de muestra que minimiza el consumo de disolvente [326,327]. La fase extractante es una microgota de un disolvente orgánico, suspendida del extremo de la aguja de una microjeringa, y expuesta a la muestra (figura II.7) [327,328]. Después del periodo de extracción, la gota se retrae hacia la aguja de la microjeringa, y finalmente se inyecta en el sistema de medida.

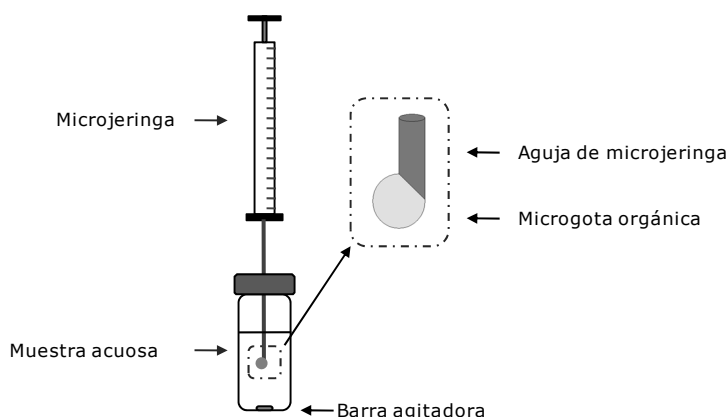


Figura II.7 Representación esquemática de un sistema de microextracción de gota suspendida en la punta de una microjeringa.

En este esquema se representa una de las modalidades de SDME, donde la gota de disolvente orgánico, inmisible en agua, se encuentra inmersa directamente en la muestra. Otra alternativa es realizar el muestreo en espacio de cabeza [329,330].

Se trata de una técnica sencilla y rápida, de bajo coste, efectiva y que requiere pocos microlitros de disolvente en cada extracción [331]. Su principal desventaja es la inestabilidad de la gota, que en ocasiones causa problemas en la repetibilidad de la extracción [323].

Esta técnica ha sido aplicada con éxito, a la extracción de PAHs de muestras de agua de grifo, pozo, manantial, río [332], agua de piscina y aguas residuales [333]. Shariati-Feizabadi y col. [333] proponen un método de SDME en espacio de cabeza, utilizando una microgota de 3 μL de 1-butanol. Hou y col. [334] optan por la inmersión directa de 3 μL de tolueno. También se han encontrado aplicaciones en las que se utilizan líquidos iónicos (hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio ($[\text{C}_8\text{MIM}][\text{PF}_6]$), tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato (FAP)) como fase extractante, mediante inmersión directa [332,335].

2.1.2.2. Microextracción líquido-líquido dispersiva

La **microextracción líquido-líquido dispersiva** (DLLME) fue introducida por Assadi y colaboradores en 2006 [336]. Se trata de una técnica de microextracción que ofrece importantes ventajas respecto a los métodos de extracción convencionales, ya que permite llevar a cabo la preparación de la muestra de una manera rápida y simple, con bajo coste, sin necesidad de utilizar grandes cantidades de disolventes orgánicos, y con posibilidad de combinarla con la mayoría de los métodos analíticos. Estas ventajas han originado que desde su introducción, haya sido utilizada para la extracción de una gran cantidad de contaminantes en muestras acuosas.

2.1.2.2.1. Principios de la técnica



Figura II.8 Fotografía de la muestra acuosa tras la inyección de la mezcla de disolventes.

DLLME está basada en un sistema de disolventes ternario, donde se utiliza una mezcla de un disolvente de alta densidad, que actúa como extractante, y un disolvente polar, miscible en agua, que ejerce la función de dispersante. Los disolventes de extracción más comunes son disolventes orgánicos clorados. Algunos ejemplos son, el clorobenceno, tetracloruro de carbono, tetracloroetileno o cloroformo. Acetona, metanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano son los disolventes dispersantes utilizados generalmente. La mezcla apropiada de disolventes de extracción y dispersante se inyecta rápidamente en la muestra acuosa que contiene los

analitos. Inmediatamente se produce una gran turbidez de la mezcla ternaria, debido fundamentalmente a la formación de gotas muy finas que están dispersadas a través de la muestra acuosa. El área superficial entre el disolvente de extracción y la muestra es muy elevada, por lo que el estado de equilibrio se alcanza rápidamente, y en consecuencia el tiempo de extracción es muy corto. De hecho, esta es una de las principales ventajas de DLLME [336,337].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

El siguiente paso es la etapa de centrifugación de la mezcla turbia, después de la cual se obtiene una fase sedimentada en el fondo del tubo. Por razones prácticas, se utilizan tubos de vidrio de fondo cónico, lo cual facilita la recuperación de la gota, que se lleva a cabo con una microjeringa. Los analitos de interés se concentran desde la muestra acuosa, en el pequeño volumen de disolvente de extracción, de modo que en una única etapa se produce la extracción y concentración de los mismos. Finalmente, la determinación de los analitos de la fase sedimentada puede realizarse mediante análisis instrumental [336,337].

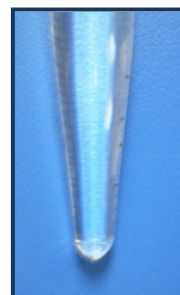


Figura II.9
Fotografía de la separación de las fases tras la etapa de centrifugación.

Recuperaciones y factores de enriquecimiento

La influencia de las distintas variables, durante la etapa de optimización de un método de DLLME, se determina utilizando los factores de enriquecimiento (EF) y las recuperaciones (R). Los EFs se definen como el cociente entre la concentración de cada compuesto en la fase sedimentada y la concentración inicial en la muestra acuosa. Las recuperaciones se calculan como el producto de los EFs por el cociente entre el volumen de la fase sedimentada y la fase acuosa multiplicando por cien.

$$EF = \frac{C_{sed}}{C_0}$$

$$R = \frac{\eta_{sed}}{\eta_{aq}} \times 100 = \frac{C_{sed} \times V_{sed}}{C_0 \times V_{aq}} \times 100$$

$$R = \left(\frac{V_{sed}}{V_{aq}} \right) EF \times 100$$

donde C_0 y C_{sed} son las concentraciones en la muestra y en la fase sedimentada respectivamente. η_{sed} η_{aq} es la cantidad de analito en la fase sedimentada y en la fase acuosa respectivamente y V_{sed} y V_{aq} son los volúmenes de la fase sedimentada y acuosa, respectivamente.

Las condiciones de extracción afectan al volumen de gota sedimentada, por lo que es necesario utilizar tanto las recuperaciones como los factores de concentración en la optimización, buscando siempre en medida de lo posible los valores máximos para ambos parámetros.

2.1.2.2.2. Variables que afectan al proceso de extracción

En DLLME, los factores que afectan a la eficiencia de la extracción son fundamentalmente el tipo y volumen de disolvente de extracción y el tipo y volumen de disolvente dispersante.

La selección de un **disolvente de extracción** adecuado es el parámetro principal del proceso de DLLME. Los disolventes orgánicos son elegidos en base a su mayor densidad que el agua, capacidad de extracción por los compuestos de interés y buen comportamiento cromatográfico. El **volumen del disolvente de extracción** tiene un efecto importante en el EF. El incremento del volumen de extractante, se traduce en un aumento del volumen de fase sedimentada, por lo que disminuye el EF. Sin embargo, la reducción del volumen de extractante está determinada por la obtención de una gota sedimentada fácilmente manipulable. Por tanto, el volumen de disolvente debe ser optimizado para conseguir, por un lado los mejores EFs, y por otro, un volumen suficiente de fase sedimentada, que permita su análisis después de la centrifugación [336,337].

La miscibilidad del **disolvente dispersante** con el disolvente de extracción y con la fase acuosa, es esencial en la selección del mismo. El **volumen de disolvente dispersante** afecta directamente al grado de dispersión del disolvente de extracción en la fase acuosa, y por lo tanto, a la eficiencia de extracción. Variaciones en el volumen de disolvente dispersante también originan cambios del volumen de la fase sedimentada. Para conseguir un volumen constante de la fase sedimentada, es necesario realizar simultáneamente cambios en los volúmenes de dispersante y extractante. El volumen de muestra y la solubilidad del disolvente de extracción, también juegan un papel importante en el volumen de la fase sedimentada. Desde el punto de vista experimental, para obtener un volumen constante de fase sedimentada es necesario realizar algunos experimentos iniciales de prueba y error [336-338].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Otros factores que conviene tener en cuenta son el tiempo y modo de extracción, el tiempo de centrifugación y la fuerza iónica [337].

En DLLME, el **tiempo de extracción** se define como el intervalo entre la inyección de la mezcla (dispersante/extractante) en la muestra acuosa, y el comienzo de la etapa de centrifugación. Generalmente, el tiempo no influye en la eficiencia de la extracción. El área superficial entre el disolvente de extracción y la fase acuosa es infinitamente larga, por lo que la transferencia de los analitos de la fase acuosa a la fase de extracción es muy rápida, y el estado de equilibrio se logra rápidamente [336-340]. No obstante, en ciertas aplicaciones se observó una influencia del tiempo en la eficiencia de la misma. Fan y col. [341] desarrollaron un método de DLLME para la determinación de aminas en muestras de agua. Observaron que la eficiencia de extracción permanece constante entre 0-5 min para todos los analitos estudiados. Sin embargo un incremento del tiempo de extracción originó la disminución de la eficiencia de extracción. Por otro lado, Zang y col. utilizan un tiempo de extracción de 3 min para la extracción de fungicidas de extractos de manzana [342]. Xia y col. [343] desarrollan un método para la determinación de un insecticida en muestras de agua con un tiempo de extracción de 2 min.

Otra posibilidad es aplicar **agitación** a la muestra justo después de la inyección de la mezcla de disolventes, para favorecer el contacto entre las fases acuosa y orgánica [344]. La agitación puede realizarse manualmente o mediante un baño de ultrasonidos.

En cuanto a la **centrifugación**, destacar que generalmente no afecta a la eficiencia de la extracción. Sin embargo es una etapa esencial para obtener dos fases diferenciadas, y por lo tanto puede afectar al volúmen de la fase sedimentada [344,339].

La **fuerza iónica** también afecta al volúmen de la fase sedimentada [337,345,346]. La adición de sal para mejorar la eficiencia de los procesos de extracción ha sido ampliamente utilizada en procesos como LLE, SPME y LPME. Generalmente, la adición de sal disminuye la solubilidad de los analitos en la fase acuosa y favorece el paso de los mismos a la fase orgánica. Así, es un parámetro de importancia a la hora del desarrollo de un método de DLLME.

2.1.2.2.3. Aplicaciones de DLLME

La primera aplicación de DLLME fue desarrollada en el año 2006 por Rezaee y col. [336], para llevar a cabo la extracción de PAHs en muestras de agua. En este método 1 mL de acetona que contiene 8.0 μL de C_2Cl_4 se inyecta rápidamente en 5 mL de la muestra acuosa, utilizando una jeringa de 1 mL. La mezcla se agita suavemente y a continuación se centrifuga durante 1.5 min a 6000 r.p.m. La fase sedimentada ($5.0 \pm 0.2 \mu\text{L}$) se analiza mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID). Los EFs y las recuperaciones variaron entre 603-1113 y 60.3-111.3%, respectivamente. La técnica desarrollada ofrece grandes ventajas como rapidez, simplicidad y bajo coste, y al mismo tiempo permite obtener altas recuperaciones y EFs. Este hecho ha originado que desde su presentación, el número de aplicaciones se haya incrementado de manera importante (tabla II.10) [338,347].

Berijani y col. [337] desarrollaron un nuevo método para la determinación de pesticidas organofosforados de muestras de agua, utilizando DLLME en combinación con cromatografía de gases y detector fotométrico de llama (GC-FPD). En este método, una mezcla de 12 μL de clorobenceno y 1 mL de acetona se inyectan rápidamente en 5 mL de muestra. Después de la etapa de centrifugación (2 min, 5000 r.p.m.), se inyectan 0.5 μL de fase sedimentada en el cromatografo de gases. En estas condiciones, los EFs y las recuperaciones variaron entre 789-1070 y 78.9-107%, respectivamente. La comparación de DLLME con SPME y SDME para la extracción de pesticidas organofosforados en agua, mostró que DLLME es un método simple que requiere menores tiempos de extracción (3 min), ya que el equilibrio se logra rápidamente. Los tiempos de extracción para SPME y SDME oscilan entre 15 y 60 min, y en la mayoría de los casos no se alcanza el equilibrio.

En 2007, Kozani y col. [345] describieron un método de DLLME para la determinación de clorobenzenos en agua. En este método se utilizan 0.5 mL de acetona como disolvente dispersante y 9.5 μL de clorobenceno como disolvente de extracción. El análisis se lleva a cabo mediante GC con detector de captura electrónica (ECD). En condiciones óptimas se consiguen recuperaciones entre 71.1 y 81.3% y límites de detección del bajo $\mu\text{g L}^{-1}$. Esta misma combinación (DLLME-GC-ECD) se ha utilizado para la determinación de trihalometanos en aguas de bebida obteniendo resultados muy satisfactorios con recuperaciones entorno al 100% para todos los compuestos analizados [348].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Por otra parte, la combinación de la DLLME con cromatografía de gases y detector de espectrometría de masas (GC-MS) se ha utilizado para la determinación de herbicidas triacinas en muestras de agua [346]. 1 mL de acetona que contienen 12 μL de clorobenceno se inyecta en 5 mL de agua que contiene un 4% de cloruro sódico (w/v). La disolución turbia se centrifuga durante 5 min a 6000 r.p.m., y posteriormente se inyectan 2 μL de la fase sedimentada en el cromatógrafo, para su análisis. Trabajando en estas condiciones se consiguen factores de enriquecimiento entre 151 y 722 y límites de detección entre 0.021 y 0.12 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabla II.10 Ejemplos de algunas aplicaciones de DLLME para la extracción de compuestos orgánicos en muestras de agua.

Análitos	Disolv. extr.	Dispersante	Determinación	R (%)	Efs	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ref
PAHs	8 μL C_2Cl_4	1 mL Ace	GC-FID	60-111	603-1113	0.007-0.03	[336]
OPPs	12 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ace	GC-FPD	79-107	789-1070	0.003-0.02	[337]
CBs	9.5 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ace	GC-ECD	71-81	711-813	0.0005-0.05	[345]
Trihalometanos	20 μL CS_2	0.5 mL Ace	GC-ECD	92-108	116-355	0.005-0.04	[348]
Triacinas	12 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ace	GC-MS	24-116	151-722	0.02-0.1	[346]
Clorofenoles	10 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ace	GC-ECD	29-91	287-906	0.01-2.0	[349]
Flatatos	9.5 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ace	GC-MS	68-89	681-889	0.002-0.008	[340]
Ésteres organofosforados	20 μL CH_3CCl_3	1 mL Ace	GC-NPD	51-114	190-830	0.01-0.08	[344]
Antioxidantes	40 μL CCl_4	2 mL AcN	HPLC-DAD	78-86	168-220	3-7	[339]
PCBs	10 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ace	GC-ECD	92-114	378-540	0.001-0.002	[350]
Anilinas	10 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	0.5 mL Ace	GC-MS	69-94	212-645	0.04-0.09	[351]
Piretroides	10 μL $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	1 mL Ace	GC-ECD	76-116	708-1087	0.04-0.1	[352]
Ácidos clorofenoxiacético	80 μL C_2Cl_4	1.92 mL THF	HPLC-UV	---	131-156	2.3-3.3	[353]
PBDEs	20 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL AcN	HPLC-VWD	87-119	268-305	0.01-0.06	[354]
Aminas aromáticas	25 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	0.5 mL MeOH	HPLC-VWD	85-112	41-95	0.8-1.8	[355]
Pesticidas organoclorados	10 μL C_2Cl_4	1 mL Ace	GC-MS	75-113	46-316	0.001-0.03	[356]
Triclosán y metiltriclosán	40 μL CH_3CCl_3	1 mL MeOH	GC-MS/MS	82-105	250	0.002-0.005	[357]
Nitroaromáticos	20 μL CCl_4	0.75 mL MeOH	GC-FID	---	202-314	0.09-0.5	[358]
Pesticidas carbamatos	70 μL CHCl_3	1 mL Ace	HPLC-DAD	84-94	101-145	0.4-1	[359]
Insecticidas heterocíclicos	0.052 g $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$	0.5 mL MeOH	HPLC-DAD	79-110	209-276	0.5-1.3	[360]
Triazoles y carbaril	15 μL $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$	1 mL AcN	HPLC-Flu	80-114	87-276	0.01-0.02	[361]
Bisfenol A	142 μL CHCl_3	2 mL Ace	HPLC-UV	93-98	150	0.07	[362]
AEDT	50 μL CCl_4	0.5 mL Ace	HPLC-DAD	89-95	---	1.7	[363]
Herbicidas fenilurea	60 μL DCM	1 mL THF	HPLC-DAD	91-104	68-126	0.1-0.3	[364]

Disolv. ext, disolvente de extracción; R, recuperación; C_2Cl_4 , tetracloretileno; Ace, acetona; GC, cromatografía de gases; FID, detector de ionización de llama; OPPs, pesticidas organofosforados; $\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$, clorobenceno; FPD, detector fotométrico de llama; CBs, clorobencenos; ECD, detector de captura electrónica; CS_2 , disulfuro de carbono; MS, espectrometría de masas; CH_3CCl_3 , 1,1,1-tricloroetano; NPD, detector de nitrógeno y fósforo; CCl_4 , tetracloruro de carbono; AcN, acetonitrilo; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; DAD, detector diodos en serie; PCBs, bifenilos policlorados; THF, tetrahidrofurano; UV, detector ultravioleta; PBDEs, difeniléteres polibromados; $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$, tetracloretoano; VWD, detector de longitud de onda variable; MeOH, metanol; MS/MS, espectrometría de masas en tandem; CHCl_3 , cloroformo; $[\text{C}_6\text{MIM}][\text{PF}_6]$, hexafluorofato de 1-hexil-3-metilimidazolio; Flu, detección de fluorescencia; AEDT, ácido etilendiaminotetracético.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

En el caso de muestras no volátiles y de elevada polaridad, que son poco adecuadas para el análisis mediante GC, es necesaria una etapa de derivatización adicional para incrementar la volatilidad de los analitos. DLLME permite realizar la derivatización y extracción en único paso, simplificando enormemente los pasos de operación y acortando el tiempo de análisis. Por ejemplo, la derivatización y extracción simultánea mediante DLLME ha sido utilizada para la determinación de clorofenoles en muestras de agua [349]. En este método, se inyectan 0.5 mL de acetona que contienen 10 μL de clorobenceno y 50 μL de anhídrido acético (reactivo para la derivatización) en 5 mL de muestra acuosa que contiene un 0.5% (w/v) de K_2CO_3 . En pocos segundos, los analitos se derivatizan y se extraen en el disolvente de extracción. La determinación se lleva a cabo mediante GC-ECD. Chiang y col. [351] han combinado DLLME con GC-MS para determinar anilinas en muestras de agua residual. En este método, las anilinas se extraen y se derivatizan de manera simultánea, inyectando 0.5 mL de acetona que contienen 10 μL de clorobenceno y 30 g L^{-1} de pentafluorobenzaldehído disuelto en metanol, en 5 mL de agua (pH=4.6).

En un principio, GC era la técnica más utilizada para analizar la fase sedimentada obtenida mediante DLLME, debido fundamentalmente a que los disolventes de extracción más comunes, no son compatibles con la fase móvil del sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) cuando se utiliza fase inversa. Sin embargo, a pesar de este inconveniente, cada vez son más las aplicaciones en las que se utiliza la cromatografía líquida acoplada a diferentes detectores para el análisis de los extractos resultantes de DLLME.

En 2007, Farajzadeh y col. [339] publicaron un estudio preliminar de la combinación de DLLME y HPLC con detector de diodos en serie (DAD) para el análisis de antioxidantes en muestras acuosas. En este método, el acetonitrilo se utiliza como disolvente dispersante (2 mL) y el tetracloruro de carbono como disolvente de extracción (40 μL). La mezcla de ambos disolventes se inyecta en 5 mL de agua, y posteriormente la disolución turbia se centrifuga durante 5 min a 2000 r.p.m. La fase sedimentada se transfiere a otro tubo y después de la evaporación del disolvente, el residuo resultante se redissuelve en 50 μL de MeOH y se inyecta en el HPLC. El método desarrollado es muy eficiente, con recuperaciones entorno al 100%.

Más recientemente, se ha utilizado la combinación DLLME-HPLC-UV para la determinación de atracina y simacina [365], diclorodifeniltricloroetano (DDT) y sus principales metabolitos [366], bisfenol A [362] o insecticidas heterocíclicos [360] en muestras acuosas.

La cromatografía líquida rápida también se ha utilizado para llevar a cabo el análisis de los extractos resultantes de DLLME. Así, se ha desarrollado un método de DLLME-UHPLC-UV, para la determinación de triclosán, triclocarbán y metiltriclosán en muestras acuosas [367]. La preconcentración se lleva a cabo mediante DLLME, utilizando 1 mL de tetrahidrofurano como disolvente dispersante y 15 μ L de 1,3-diclorobenceno como disolvente de extracción. Después de la etapa de centrifugación (5 min, 3000 r.p.m.) se evapora el disolvente, y el residuo resultante se redissuelve en 35 μ L de MeOH antes de proceder a su análisis.

Finalmente, destacar que DLLME no sólo ha sido aplicada a la extracción y preconcentración de compuestos orgánicos, sino que también se han desarrollado metodologías para la determinación de compuestos inorgánicos, como por ejemplo, iones metálicos [368]. Jahromi y col. [369] han publicado un método para la determinación de cadmio en muestras de agua, utilizando DLLME acoplada a ET-AAS. 0.5 mL de metanol que contienen 34 μ L de tetracloruro de carbono y 0.1 mg de ditiocarbamato de amonio pirrolidina se inyectan rápidamente en la muestra acuosa que contiene los iones cadmio. Posteriormente se lleva a cabo la etapa de centrifugación (2 min, 5000 r.p.m.) y los iones contenidos en la fase sedimentada se determinan mediante ET-AAS. Trabajando en estas condiciones se obtiene un EF de 125 y recuperaciones entorno al 90% para todas las muestras acuosas analizadas. Otros métodos similares combinan la DLLME con instrumentos espectroscópicos para la determinación de plomo [370], oro [371] o paladio [372], entre otros.

2.1.2.2.4. Desarrollos recientes en DLLME

DLLME es una técnica que surge hace relativamente poco tiempo, por lo que resulta razonable que sufra un constante desarrollo, y que el número de aplicaciones se haya incrementado de manera importante en los últimos años. Las primeras aplicaciones, se centraban únicamente en la preparación de muestras de agua de consumo o medioambientales. Más recientemente, el campo de aplicación se ha ampliado a muestras biológicas, como orina [373], sangre humana [374] y

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

fluidos biológicos [375]; matrices alimentarias, como leche, yema de huevo, aceite de oliva [376], miel [377], frutas [342,378] y pescados [379]; e incluso a muestras de suelo [380-382].

DLLME también se ha utilizado como técnica de purificación y concentración combinada con SPE [382-384]. Liu y col. [385] han desarrollado una metodología de SPE-DLLME-GC-ECD para la determinación de PBDEs en muestras de agua y plantas. Después de la preconcentración y purificación de las muestras en un cartucho de C₁₈, 1 mL del eluyente, que contiene 22 µL de 1,1,2,2-tetracloroetano se inyecta rápidamente en 5 mL de agua pura. Después de la etapa de centrifugación, la fase sedimentada se inyecta en el GC-ECD. Bajo condiciones óptimas, los EFs oscilan entre 6838-9405. Montes y col. [386] proponen un método de SPE-DLLME para la determinación de fungicidas en muestras de vino. 20 mL de vino se concentran utilizando un adsorbente en fase reversa. A continuación, los compuestos de interés se eluyen con 1 mL de acetona. Este extracto se mezcla con 0.1 mL de 1,1,1-tricloroetano y la mezcla obtenida se añade a 10 mL de agua ultrapura. El método proporciona EFs entorno a 200 y se observa una mejora en la selectividad si se compara con el método de SPE simple.

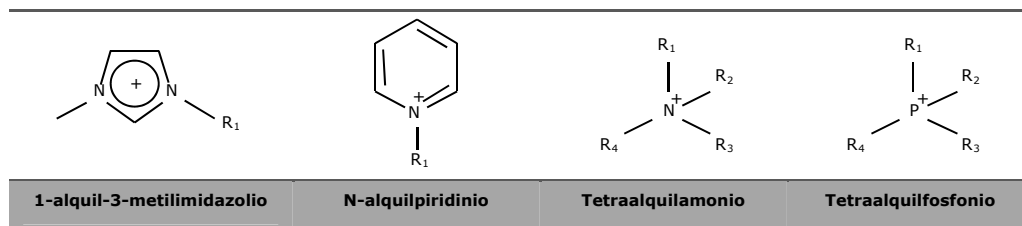
En 2007, se ha desarrollado una nueva aplicación de la técnica [387], donde se sustituyen los disolventes orgánicos clorados, por disolventes con bajos puntos de fusión y densidad inferior a la del agua, como el 1-undecanol, 1-dodecanol, 2-dodecanol, 1-tetradecilalcohol o el n-hexadecano [388,389]. En este caso, tras la etapa de centrifugación, la gota de extractante no se deposita en el fondo del tubo de extracción, sino que flota sobre la superficie de la muestra. La recuperación del extractante se lleva a cabo mediante la solidificación de la gota orgánica flotante (solidification of floating organic drop, SFO). Leong y col. [390] desarrollaron un método de DLLME-SFO-GC-MS para llevar a cabo el análisis de compuestos orgánicos halogenados en muestras de agua. Una mezcla de 0.5 mL de acetona que contiene 10 µL de 2-dodecanol se inyecta rápidamente utilizando una jeringa, en 5 mL de la muestra acuosa. Después de centrifugar, las finas gotas de 2-dodecanol están flotando por la parte superior de la muestra acuosa. A continuación, el tubo que contiene la mezcla se introduce en un baño de hielo durante 5 min. Después de este tiempo, el 2-dodecanol solidificado se transfiere a un vial a temperatura ambiente hasta que pasa nuevamente a estado líquido. Finalmente, se inyectan 2 µL en GC-MS. Trabajando en estas condiciones se

consiguen EFs y recuperaciones que varían entre 228-322 y 81-102%, respectivamente.

Otra técnica relacionada es la emulsificación-microextracción asistida por ultrasonidos (ultrasound-assisted emulsification-microextracion, USAEME). Se trata de una técnica híbrida entre DLLME y la LLE asistida por ultrasonidos (ultrasound-assisted liquid-liquid extraction, USALLE). USAEME consiste en la adición del disolvente extractante a la muestra y someter la mezcla a radiación de ultrasonidos. Tras un tiempo de extracción, la mezcla se centrifuga y se obtiene la fase sedimentada [391]. A diferencia de DLLME, se utiliza un sistema binario de disolventes, ya que en este caso el disolvente dispersante se sustituye por el poder emulsionante de la radiación de ultrasonidos. Esta metodología se ha aplicado para la determinación de conservantes fenólicos [392], pesticidas [393], PCBs [394], PAHs [395] y PBDEs [396] en aguas.

2.2.2.2.4.1 Líquidos iónicos como fase extractante

Los **líquidos iónicos** (ILs), también llamados líquidos iónicos a temperatura ambiente ("*room-temperature ionic liquids*", RTILs), son sales líquidas a temperatura ambiente, debido a que presentan puntos de fusión inferiores a esta temperatura. Estos compuestos resultan de la combinación de un catión orgánico y un anión orgánico o inorgánico. La mayoría de los ILs estudiados están formados por los cationes 1-alkil-3-metilimidazolio ($[C_nMIM]^+$), N-alkilpiridinio, tetraalkilamonio, o tetraalkilfosfonio (**figura II.10**). Los aniones más utilizados son el hexafluorofosfato $[PF_6]^-$, tetrafluoroborato $[BF_4]^-$, trifluorometilsulfonato $[CF_3SO_3]^-$, bis[(trifluorometil)sulfonyl]amida $[(CF_3SO_2)_2N]^-$, trifluoroetanoato $[CF_3CO_2]^-$, acetato $[CH_3CO_2]^-$, nitrato y haluros [397-399].



($R_{1,2,3,4}$, alquil)

Figura II.10 Cationes de algunos de los líquidos iónicos más estudiados.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Las propiedades fisicoquímicas de los ILs dependen de la naturaleza y tamaño del catión y del anión [400,401]. Por ello, debido a que la única combinación de cationes y aniones influye en las propiedades de los ILs, a estos disolventes se les ha denominado disolventes diseñados [402]. La tabla II.11 muestra algunas propiedades físicas de los ILs más utilizados en Química Analítica.

Tabla II.11 Propiedades físicas de los ILs más utilizados en Química Analítica [403].

ILs	Punto fusión (°C)	Densidad (g mL ⁻¹)	Viscosidad (mPa s)	Solubilidad en agua (g/100 mL)	Conductividad (S cm ⁻¹)
[C ₄ MIM][PF ₆]	10, -8	1.36-1.37 (25°C)	148-450 (25°C)	1.88	0.14 (25°C)
[C ₆ MIM][PF ₆]	-61	1.29-1.31 (25°C)	560-586 (25°C)	0.75	
[C ₈ MIM][PF ₆]	22	1.20-1.23(25°C)	682-710 (25°C)	0.20	
[CMIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]	-3	1.56	44 (20°C)		0.84 (20°C)
[C ₂ MIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]	-4	1.50	34 (20°C)	1.77	0.88 (20°C)
[C ₄ MIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]		1.42	52 (20°C)	0.80	0.39 (20°C)
[C ₆ MIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]		1.33		0.34	
[C ₈ MIM][(CF ₃ SO ₂) ₂ N]		1.31		0.21	
[C ₄ MIM][Cl]	65.41	1.10 (25°C)	Sólido	Miscible	Sólido
[C ₂ MIM][BF ₄]	15	1.28 (25°C)	37 (25°C)	Miscible	
[C ₄ MIM][BF ₄]	-81	1.21 (25°C)	180 (25°C)	Miscible	0.17 (25°C)
[C ₆ MIM][BF ₄]			314 (20°C)	Miscible	
[C ₄ MIM][CF ₃ SO ₃]	16	1.29 (20°C)	90 (20°C)	Miscible	0.37 (20°C)

Sus aplicaciones en Química Analítica, especialmente en la separación de analitos, son importantes debido a que poseen propiedades únicas tales como buena estabilidad térmica y oxidativa, conductividad iónica intrínseca, una amplia ventana de potenciales electroquímicos, excelentes propiedades de transferencia de calor, eficiente absorción y transmisión de microondas, viscosidad y densidad variables, miscibilidad selectiva con agua o disolventes orgánicos, síntesis económica, así como buena extractabilidad para compuestos orgánicos e iones metálicos. Sin embargo, las propiedades que los ha hecho más conocidos son su baja presión de vapor e inflamabilidad, incluso a elevadas temperaturas. Debido a estas últimas propiedades los ILs producen una cantidad mínima de compuestos orgánicos volátiles, el potencial inflamable se ve minimizado y pueden ser recuperados y reciclados, hecho que les ha proporcionado un papel importante dentro de la química verde debido a su carácter beneficioso para el medio ambiente [404,405].

Los ILs aparecen en la década de los noventa, principalmente para ser utilizados como medio de reacción y así reemplazar a los disolventes orgánicos convencionales [402,406]. Una década después han sido incorporados a muchas otras áreas y, recientemente, han captado el interés y la imaginación de la comunidad analítica. Así, en los últimos años han sido una pieza importante de las innovaciones en separaciones analíticas, espectrometría de masas, electroquímica, espectroscopía y química de sensores [399,401,403].

El número de publicaciones centradas en el uso de la microextracción líquido-líquido dispersiva con ILs (IL-DLLME) es aún muy reducido, y hay que destacar que hasta el momento de realización del trabajo recogido en esta memoria, no existía ningún método, donde se utilizaran IL-DLLME para la extracción de PAHs de aguas medioambientales.

Las metodologías publicadas se centran en la determinación de pesticidas piretroides [407], aminas aromáticas [341], insecticidas heterocíclicos [360] y fenoles [408] en muestras acuosas. También se han descrito algunas aplicaciones de IL-DLLME para la extracción de drogas antiinflamatorias no esteroideas en orina [373], pesticidas en frutas (tras una etapa previa de extracción mediante ultrasonidos) [378], así como la extracción de algunos lantanoides en polvo de dióxido de uranio [409].

Dentro de las aplicaciones de IL-DLLME, nos encontramos con que no existe un procedimiento estandarizado para la realización de la extracción. Algunos trabajos se basan en los principios básicos de DLLME y utilizan el IL en combinación con un disolvente dispersante, mientras que algunas aplicaciones se basan en un sistema binario de disolventes. La extracción de insecticidas heterocíclicos se lleva a cabo inyectando una mezcla de 0.052 g de $[C_6MIM][PF_6]$ y 0.5 mL de metanol en la muestra acuosa [360]. Sin embargo, el método descrito para la extracción de aminas aromáticas [341] consiste en la mezcla directa del IL con la muestra acuosa.

Generalmente, las metodologías en las que se prescinde de disolvente dispersante, requieren de algún procedimiento de mezcla del IL con la muestra acuosa. Se han descrito aplicaciones en los que se sigue el protocolo habitual de DLLME, seguido de agitación de la mezcla y centrifugación para la obtención de la fase sedimentada [341]. En otros casos, se procede de igual forma pero con control

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

de temperatura [407]. El IL se añade sobre la muestra y esta mezcla se mantiene a alta temperatura para favorecer la miscibilidad de las fases. Después se enfría en baño de hielo, para disminuir la solubilidad del extractante, y por último se centrifuga.

Exceptuando el método de determinación de lantanoides, donde se utiliza ICP-OES; todas las aplicaciones mencionadas anteriormente utilizan HPLC como técnica de separación. La baja presión de vapor y elevada viscosidad de los ILs, impide su inyección directa en un cromatógrafo de gases, hecho que constituye la principal limitación del uso de ILs como fase extractante. No obstante, hay que destacar que recientemente, Aguilera-Herrador y col. [410-412] han desarrollado una interfase, que ha permitido el acoplamiento directo de la microextracción con gota colgante utilizando IL como fase extractante, con la cromatografía de gases. El dispositivo se coloca en el inyector del cromatógrafo, donde se lleva a cabo la desorción térmica de los analitos del IL y posteriormente se recoge libre de analitos, evitando el contacto con la columna cromatográfica.

Por otro lado, Chisvert y col. [413] proponen el uso de un dispositivo basado en tubos de vidrio concéntricos, para llevar a cabo la desorción térmica de los analitos de la gota de IL (utilizada como fase extractante en la microextracción con gota suspendida), hacia el sistema de cromatografía de gases. La gota de IL se coloca dentro de un tubo de vidrio Pyrex (20 mm), y éste a su vez, se introduce en otro tubo de vidrio comercial (187 mm), que se utiliza habitualmente en procesos de desorción térmica, durante la extracción en fase sólida con barras agitadoras. Los extremos del tubo exterior se sellan con lana de vidrio, y el dispositivo completo se coloca en el sistema de termodesorción acoplado al cromatógrafo. De este modo, se evita que el IL entre en contacto con el sistema cromatográfico evitando problemas con el inyector y con la columna cromatográfica.

2.1.2.3. Microextracción en fase líquida con fibra hueca

Pedersen-Bjergaard y Rasmussen introdujeron en 1999 la **microextracción en fase líquida con fibra hueca** (hollow fiber-liquid phase microextraction, HF-LPME) [414], como solución para mejorar la estabilidad de la gota en SDME.

En HF-LPME, la fase extractante se encuentra en el interior de una membrana y no está en contacto directo con la muestra. Una fibra hueca, generalmente de polipropileno poroso, se empapa con un disolvente orgánico, con el fin de inmovilizarlo en los poros, mediante fuerzas capilares. En el interior de la membrana se introduce una fase aceptora, que puede ser el disolvente inmovilizado en los poros de la fibra, o bien una disolución acuosa ácida o alcalina. La fibra se expone a la muestra acuosa y los analitos se extraen a través de la fase orgánica de los poros, y pasan a la disolución aceptora del interior de la membrana. Para favorecer el proceso es habitual el uso de agitación [415,416].

Las fibras más utilizadas para la extracción de PAHs, son fibras de polipropileno, con diámetro interno de 600 μm , espesor de pared de 200 μm y tamaños de poro de 0.2 μm [133,417]. Los disolventes de extracción utilizados son n-hexano [418], tolueno [133] y 1-octanol [417].

En general, la eficiencia de la extracción lograda por HF-LPME es mayor que con SDME directa, ya que la fibra hueca permite el uso de velocidades de agitación mayores, que aceleran la cinética de la extracción. Además, el uso de la fibra hueca permite el análisis de muestras sucias. El pequeño tamaño de poro de la fibra permite la microfiltración de las muestras, produciendo así extractos muy limpios. En consecuencia, HF-LPME permite la extracción y preconcentración de analitos de muestras complejas de un modo simple y económico.

2.1.2.4. Extracción con disolventes asistida por membranas

Los principios básicos de la **extracción con disolventes asistida por membranas** (membrane-assisted solvent extraction, MASE), son similares a los de HF-LPME. Las principales diferencias se encuentran en el tipo de membrana utilizada y en el volumen de disolvente, ya que en MASE se utilizan membranas hidrofóbicas no porosas, como el polietileno de baja densidad o el polipropileno de alta densidad, y mayores volúmenes de disolvente (hasta 1 mL). Los analitos orgánicos presentes en la muestra acuosa, difunden a través de la membrana y se concentran en el pequeño volumen de disolvente orgánico [419-421].

Las ventajas de utilizar una membrana entre las dos fases es que se previene la formación de emulsiones, al mismo tiempo que excluye los compuestos macromoleculares y las partículas presentes en la muestra. Esto hace que la técnica

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

sea especialmente adecuada para muestras complejas con alto contenido en materia orgánica [419,422].

MASE es una técnica simple y con bajo consumo de disolvente y posibilidad de automatización y acoplamiento en línea con los instrumentos analíticos. Además, las membranas son lo suficientemente rígidas y estables para permitir la agitación de la muestra a gran velocidad [422,423]. La mayor desventaja de la técnica, es que no es apropiada para la extracción de analitos altamente hidrofílicos, muy solubles en la muestra acuosa, y con baja capacidad de difusión a través de la membrana.

Esta técnica se ha aplicado para la extracción de PAHs de una gran diversidad de muestras, como agua de río [424], agua de mar [425], zumo [424,426], vino tinto y leche [424]. En la mayoría de las aplicaciones se utiliza una membrana de polipropileno de alta densidad y disolventes como ciclohexano [426], acetato de etilo [424] o mezclas de ambos [425].

2.1.2.5. Microextracción en fase sólida

La **microextracción en fase sólida** (solid-phase microextraction, SPME) es una técnica de preparación de muestra desarrollada por Belardi y Pawliszyn en 1989 [427]. Se basa en la utilización de una fibra de sílice fundida, recubierta con una fase estacionaria adsorbente de naturaleza polimérica. La fibra se expone a la muestra acuosa a analizar, bien mediante inmersión directa o muestreo en espacio de cabeza. Después de un tiempo de muestreo determinado, la fibra se retrae y la jeringa se retira del vial de muestreo. Inmediatamente después, la jeringa se introduce en el inyector de un instrumento analítico (GC o HPLC), donde los analitos son desorbidos térmicamente o por disolución en la fase móvil, según la técnica utilizada [428-430].

Los parámetros que afectan a la extracción son el recubrimiento polimérico de la fibra (la naturaleza química del analito determina qué tipo de fases deben usarse en la extracción), la temperatura y tiempo de extracción, el efecto salino, pH de la muestra, volumen de muestra, agitación y derivatización.

Se trata de un método portátil y simple, que puede ser automatizado y acoplado con instrumentación analítica. Además, la SPME evita el uso de

disolventes orgánicos, tiene un elevado poder de concentración y no requiere grandes volúmenes de muestra. Las principales desventajas se centran en que los recubrimientos de la fibra son generalmente caros, y para algunas aplicaciones tienen tiempos de vida limitados, y que existe la posibilidad de efecto memoria.

Existen numerosas aplicaciones de esta técnica a la extracción de PAHs de muestras acuosas. El recubrimiento de fibra más utilizado es el polidimetilsiloxano (PDMS) [431-433]. No obstante, existen algunas aplicaciones donde se opta por recubrimientos diferentes, como el PDMS/divinilbenceno [434,435], carbowax/divinilbenceno [434,436], poliacrilato [437,438], o recubrimientos basados en polianilina [436], dietoxidifenilsilano o (3-aminopropil)triethoxisilano [439].

2.1.2.6. Extracción con barras agitadoras

La **extracción en fase sólida con barras agitadoras** (stir bar sorptive extraction, SBSE) fue introducida por primera vez por Baltussen y col. [440] en 1999. En esta técnica se utilizan barras agitadoras (también llamadas twisters), recubiertas con una fase de PDMS, generalmente de 0.3-1 mm de espesor [441]. El proceso de extracción está basado en el equilibrio entre PDMS-agua y se basa en dos etapas, la extracción y la desorción [428,442].

La barra agitadora recubierta de polímero, se pone en contacto con la muestra que contiene los analitos, bien por inmersión directa (figura II.11a) o mediante muestreo en espacio de cabeza (figura II.11b) y se agita bajo condiciones controladas [442]. El tiempo de extracción se controla cinéticamente, y está determinado por el volumen de muestra, la velocidad de agitación, la temperatura y las dimensiones de la barra agitadora, y debe optimizarse para cada aplicación [429,430,443]. Tras la etapa de extracción, la barra agitadora se retira, y se enjuaga con agua destilada para eliminar sales, azúcares, proteínas u otros componentes de la muestra. Posteriormente se seca con un papel limpio para eliminar el agua, y pasar a la etapa de desorción. La etapa de lavado no origina pérdida de los analitos, ya que están adsorbidos a la fase polimérica [442,444].

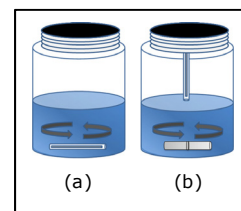


Figura II.11 Modos de extracción en SBSE; a) inmersión, b) espacio de cabeza.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Finalmente se realiza una etapa de desorción térmica o líquida. La mayoría de las aplicaciones de SBSE implican el uso de desorción térmica seguida por GC para recuperar los analitos concentrados en la barra agitadora recubierta. La desorción se realiza a temperaturas entre 150-300°C y tiempos entre 10-15 min. Este tipo de desorción evita el uso de disolventes orgánicos y permite la introducción completa de los analitos extraídos, en el sistema cromatográfico. La desorción líquida es una alternativa cuando se analizan solutos térmicamente lábiles, cuando las separaciones se llevan a cabo utilizando cromatografía líquida, electroforesis capilar o si no se dispone del dispositivo de desorción térmica en GC. La barra agitadora se introduce en un disolvente o mezcla de disolventes para la desorción química de los analitos extraídos. El volumen mínimo de disolvente debe garantizar la inmersión completa de la barra recubierta y, obviamente, los disolventes utilizados deben ser compatibles con el polímero.

La principal desventaja de esta técnica, es que a nivel comercial sólo se dispone de barras agitadoras Twister® (Gerstel, Mülheim, Alemania), recubiertas de PDMS [430]. La baja polaridad de este polímero origina que estas barras agitadoras no sean adecuadas para la extracción de compuestos polares.

Existen numerosas aplicaciones de esta técnica para la extracción de PAHs de muestras de aguas de diferente naturaleza [445-448]. Popp y col. [449] han aplicado la SBSE para la extracción de PAHs de muestras de agua de lluvia, subterráneas y agua residual procedente de una industria química. Una barra agitadora de 10 mm y 50 μ L de PDMS se introduce en 10 mL de muestra acuosa. La extracción se realiza durante 60 min con una agitación de 1000 r.p.m. La desorción de los analitos se lleva a cabo en 150 μ L de acetonitrilo, aplicando radiación de ultrasonidos durante 10 min. Los extractos resultantes se analizaron mediante HPLC-Flu. Utilizando este método se consiguieron recuperaciones entre 58-111% y límites de detección del orden del bajo ng L⁻¹. La combinación de SBSE-HPLC-Flu también se ha aplicado a la determinación de PAHs en aguas de bebida, utilizando barritas de 10 mm y 24 μ L de PDMS. En este caso la extracción se lleva a cabo durante 40 min a 60°C, obteniendo recuperaciones relativas entorno al 100% para todos los compuestos estudiados [125]. Por su parte, Lacorte y col. [450] proponen una metodología de SBSE-GC-MS para la determinación de 48 contaminantes orgánicos persistentes, entre los que se encuentran 16 PAHs, en muestras de hielo del Ártico. El proceso de extracción consiste en introducir una

barrita agitadora de 20 mm de longitud y 10 mm de espesor de fase (126 μL de PDMS) en 100 mL de hielo derretido, y agitarlo durante 24 h a 900 r.p.m. A continuación, la barrita se retira con pinzas, se enjuaga con agua ultrapura y se seca con un papel. Finalmente, se lleva a cabo la desorción térmica y la determinación por GC-MS, obteniendo recuperaciones satisfactorias para todos los analitos estudiados.

2.1.3. OTRAS TÉCNICAS ALTERNATIVAS

2.1.3.1. Extracción por punto nube

La **extracción por punto nube** (cloud point extraction, CPE) está basada en la separación de fases, que ocurre en disoluciones acuosas de surfactantes, cuando se altera la temperatura. En este tipo de extracción, la concentración de surfactante debe exceder un cierto umbral, denominado concentración micelar crítica, a partir de la cual los monómeros de surfactante tienden a agregarse para formar micelas y grandes coloides.

La muestra se pone en contacto con el surfactante durante un periodo de tiempo corto. Los analitos se incorporan a los agregados micelares presentes en disolución. A continuación, se modifica la temperatura por debajo o por encima (según sea un surfactante no iónico o zwitteriónico, respectivamente) de su temperatura de punto nube. Esta temperatura se define como aquella a la cual la disolución adquiere una cierta turbidez, y da lugar a la separación de dos fases, una acuosa, y otra donde se concentra la mayor cantidad de surfactante. Finalmente, se lleva a cabo una etapa de centrifugación, consiguiendo la concentración de los analitos en el pequeño volumen (50-400 μL) de la fase rica en surfactante [451,452].

Esta técnica se ha utilizado para la extracción de PAHs de agua de consumo [453,454], medioambientales [128,453,455] y aguas residuales [128]. Los surfactantes más comunes son de tipo no iónico [453,456,457], como el Triton X-114 o el Tergitol 15-S-7, aunque también se encuentran aplicaciones con surfactantes aniónicos [128,454,455] o con base de silicona [458].

El uso de CPE ofrece ventajas como la posibilidad de concentrar PAHs con elevadas recuperaciones y factores de preconcentración, evitar el uso de grandes

cantidades de disolventes orgánicos tóxicos, bajo coste, ya que se utilizan pequeñas cantidades de surfactante, minimización de las pérdidas debidas a la adsorción de PAHs en los recipientes, y posibilidad de determinar PAHs asociados a ácidos húmicos [455,456].

2.2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS SÓLIDAS

2.2.1. EXTRACCIÓN SOXHLET

La extracción **Soxhlet** es uno de los métodos estándar de extracción de muestras sólidas más utilizado desde su diseño en 1879; y actualmente es el principal método de referencia con el que se comparan otros métodos de extracción [459-461].

En este procedimiento, la muestra sólida finamente pulverizada, se coloca en un cartucho de material poroso que se sitúa en la cámara del extractor Soxhlet. Se calienta el disolvente extractante, situado en el matraz, se condensan los vapores que caen sobre el cartucho que contiene la muestra, extrayendo los analitos solubles. Cuando el nivel del disolvente condensado en la cámara alcanza la parte superior del sifón lateral, el disolvente, con los analitos disueltos asciende por el sifón, y retorna al matraz de ebullición. Este proceso se repite hasta que se completa la extracción de los analitos de la muestra y se concentran en el disolvente [459,462].

Esta técnica presenta ventajas, como por ejemplo que la muestra está en contacto repetidas veces con porciones frescas de disolvente, que no es necesaria la filtración después de la extracción, y que se obtienen excelentes recuperaciones. Sin embargo, presenta también claras desventajas, como son un elevado consumo de disolventes, el tiempo requerido para llevar a cabo la extracción (8-48 horas) y la limitación para llevar a cabo la extracción de varias muestras simultáneamente [460,463].

Existen innumerables aplicaciones en las que se utiliza la extracción Soxhlet, como técnica de preparación de muestras sólidas en la determinación de PAHs. En la mayoría de ellas, la extracción se lleva a cabo con disolventes de baja polaridad. El diclorometano es uno de los disolventes más comunes, y ha sido empleado en la extracción de muestras de suelo [192,464,465] lodo [172,464],

sedimento [466,467], hígado de pescado [468] y alimentos. Otras aplicaciones utilizan n-hexano [469] en la extracción de pescados y alimentos [149], tolueno en la extracción de lodo [470], o mezclas de hexano-diclorometano [182,471-473], hexano-acetona [474,475] o diclorometano-acetona [476] en la extracción de matrices de naturaleza similar.

La cantidad de muestra, el volumen de disolvente y el tiempo de extracción, dependen de cada aplicación en concreto, pero los sistemas más habituales se encuentran en los rangos de 1-50 g de muestra, 50-200 mL de disolvente y 6-48 h de extracción. Por otro lado, las muestras que presentan un elevado contenido de humedad, como por ejemplo tejidos biológicos de animales o plantas, suelen mezclarse con sulfato sódico anhidro [465,467,472,474], para reducir su contenido en agua y favorecer la penetración del disolvente en la matriz. Otras alternativas son el secado por congelación a vacío o liofilización de las muestras antes de la extracción.

2.2.2. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR ULTRASONIDOS

La **extracción asistida por ultrasonidos** (ultrasound-assisted solvent extraction, USE) es otra técnica convencional, utilizada de manera habitual para la extracción de contaminantes en muestras sólidas.

Los ultrasonidos son ondas sonoras con una frecuencia de vibración entre 16 kHz a 1 GHz. Esas ondas generan en el medio un fenómeno conocido como cavitación acústica, que consiste en la formación de burbujas y su posterior implosión [477,478]. El colapso de estas burbujas genera microgradientes con elevadas presiones y temperaturas, durante intervalos de tiempo cortos [479].

En Química Analítica, la irradiación con ultrasonidos ha sido utilizada como una herramienta poderosa, para la extracción de diferentes analitos de muestras sólidas. La muestra sólida se deposita en un tubo de vidrio, se añade la cantidad suficiente de disolvente orgánico y se agita con ultrasonidos durante el tiempo necesario. Generalmente, el tubo se introduce en un baño de ultrasonidos, aunque también existe la posibilidad de introducir una aguja sónica en la muestra [462,477,480]. El efecto mecánico de ultrasonidos favorece la penetración del disolvente en el sólido, acelerando la transferencia de masa y mejorando la eficiencia de la extracción [480,481].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Después de la extracción, se separa por centrifugación y/o filtración, el extracto que contiene los analitos de interés. Posteriormente, se repite el proceso añadiendo en cada extracción un nuevo volumen de disolvente orgánico, combinando finalmente todos los extractos obtenidos.

Las variables que afectan al sistema, y por lo tanto a la eficiencia de la extracción, son la frecuencia e intensidad de la radiación, tipo de disolvente, tiempo de extracción, temperatura y tamaño de partícula de la muestra.

Se trata de un método simple, que ofrece la posibilidad de realizar varias extracciones simultáneamente. Por otro lado, no se requiere un equipo especializado, de modo que la técnica es relativamente barata si se compara con métodos de extracción más modernos. Las extracciones pueden realizarse a temperaturas poco elevadas, por lo que esta técnica es adecuada para la extracción de analitos térmicamente lábiles [461,463,478]. Entre los principales inconvenientes de la técnica se encuentran el elevado consumo de disolvente, la necesidad de una etapa de centrifugación y/o filtración después de la extracción y que no es una técnica fácilmente automatizable [461,478,482].

Esta técnica se ha empleado para la extracción de PAHs de una gran variedad de matrices sólidas. La mayoría de las aplicaciones utilizan diclorometano [183,193,483-485], hexano [198,486], o mezclas de ambos [487,488], para la extracción de PAHs de suelo, sedimento, lodo, alimentos o material biológico. Sin embargo, también se han descrito algunas metodologías, donde se emplean disolventes de polaridad más elevada, como acetona [198,489], metanol [179,490] o acetato de etilo [491,492]; o bien mezclas de disolventes de diferente polaridad, como acetona-diclorometano [493,127] o diclorometano-metanol [169].

2.2.3. EXTRACCIÓN CON FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

La **extracción con fluidos supercríticos** (supercritical fluid extraction, SFE) es una técnica que utiliza un disolvente en su estado supercrítico. Los fluidos supercríticos presentan propiedades intermedias entre un gas y un líquido, que favorecen su penetración en diferentes matrices y, por lo tanto la solubilización de los solutos. Además, la densidad puede ajustarse variando la presión y la temperatura, de modo que pueden realizarse extracciones altamente selectivas [494].

Durante la extracción, el fluido se bombea a una presión superior a su punto crítico, a través de la muestra que está colocada en una celda de extracción. La temperatura de la celda se incrementa hasta superar el valor crítico del fluido. Después de la despresurización, los analitos se recogen en un pequeño volumen de disolvente orgánico o en un adsorbente sólido colocado en una trampa. La extracción puede tener lugar en modo estático, dinámico o mediante recirculación. En el modo dinámico, la celda se llena con el fluido supercrítico y se deja a presión elevada hasta alcanzar el equilibrio, mientras que en la extracción dinámica, el fluido supercrítico pasa de forma continua a través de la celda. En el modo de recirculación, como su propio nombre indica, el mismo fluido se bombea repetidamente a través de la muestra [494].

Aunque se han investigado numerosos fluidos supercríticos, el CO₂ es el más utilizado, debido a que alcanza el estado supercrítico a presiones (7 MPa) y temperaturas (31.3 °C) relativamente bajas. Además, presenta ventajas adicionales, ya que es no tóxico, no inflamable, no corrosivo, inerte químicamente y asequible. Por otro lado, aunque el CO₂ es apolar, su polaridad puede ajustarse adicionando modificadores como acetona o metanol [461,495,496].

La eficiencia de SFE está afectada por un gran rango de parámetros como la naturaleza del fluido supercrítico, la temperatura y la presión, el tiempo de extracción, la forma de la celda de extracción, el tamaño de partícula de la muestra, el tipo de matriz, el contenido en humedad y el sistema de recogida de los analitos. El gran número de parámetros que afectan a la eficiencia de extracción, produce dos efectos contrapuestos. Por una parte, un mayor número de variables proporciona un mayor grado de selectividad, y por otra, hace que la optimización de un método sea una tarea tediosa y difícil desde el punto de vista práctico. Este hecho, junto con el alto coste del equipo, constituyen las principales desventajas de esta técnica [461,497]. Como principales ventajas, se encuentran la posibilidad de manipular pequeños volúmenes de muestra y disolvente, reducción del tiempo de análisis, fácil automatización y baja toxicidad.

La SFE ha sido aplicada con éxito en la extracción de PAHs de matrices complejas como lodos [186,498], suelos [499,500] o alimentos [501]. Esta técnica aporta ventajas adicionales frente a las metodologías más convencionales, ya que permite la extracción selectiva de los PAHs y ofrece la posibilidad de incluir un adsorbente en el sistema, consiguiendo la extracción y purificación en un solo paso.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Sakamoto y col. [502] han aplicado la SFE para la extracción selectiva de PAHs de partículas de emisión de motores diesel. La extracción se lleva a cabo con CO₂ y el proceso consta de dos etapas claramente diferenciadas. En un primer paso, se realiza una extracción a 40 °C y 10 MPa durante 15 min, consiguiendo la extracción de los n-alcanos de las partículas diesel. En una segunda etapa, se lleva a cabo una extracción a 120 °C y 30 MPa, durante 30 min, consiguiendo la liberación de los analitos de interés, que finalmente se recogen en 5 mL de tolueno. Los extractos resultantes se analizan mediante GC equipado con un espectrómetro de masas de iones secundarios con detección de tiempo de vuelo (time of flight secondary ion mass spectrometry, TOF-SIMS). Por otro lado, Yeakub y col. [501] han desarrollado un método, mediante el cual consiguen, la extracción de PAHs de muestras de pescado ahumado, y la reducción de las interferencias originadas por los lípidos, presentes en cantidades importantes en las matrices biológicas. 0.5 g de muestra se homogenizan previamente con 2 g de C₁₈, y la mezcla resultante se introduce en la cámara de extracción. El proceso de extracción tiene lugar a 100 °C y 350 bar, durante una etapa estática de 5 min y otra dinámica de 25 min; utilizando CO₂ como fluido supercrítico. Los analitos se recogen en diclorometano y se analizan mediante GC-MS.

Finalmente, cabe mencionar, que aunque gran parte de las metodologías, utilizan CO₂ puro para la extracción de PAHs [186,501,503]; en algunas aplicaciones se ha demostrado, que las interacciones entre la matriz y los analitos pueden reducirse, si se utilizan modificadores. Los modificadores cambian la polaridad del fluido supercrítico e incrementan su poder de solvatación, favoreciendo la extracción [504]. Metanol [505,506] y tolueno (5-10%) [498,507] son los modificadores más habituales en la extracción de estos contaminantes, dando lugar a mejoras significativas en las recuperaciones, cuando se comparan con la extracción con CO₂ puro.

2.2.4. EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS

La **extracción asistida por microondas** (microwave-assisted extraction, MAE) ha despertado un gran interés en el campo de la Química Analítica, ya que constituye una herramienta poderosa, que permite la extracción rápida y eficiente de analitos, desde matrices sólidas de elevada complejidad. Por otro lado, MAE ofrece mejoras respecto a las técnicas de extracción convencionales, ya que ofrece

la posibilidad de realizar la extracción simultánea de un elevado número de muestras, y además permite la reducción del tiempo de extracción y del consumo de disolvente, superando así las principales limitaciones de Soxhlet y USE.

2.2.4.1. Principios de la técnica

2.2.4.1.1. Calentamiento mediante energía de microondas

Las microondas son ondas electromagnéticas cuyo intervalo de frecuencias se encuentra entre 300 y 3×10^6 MHz. En este intervalo de frecuencias, la radiación interacciona con la materia provocando el desplazamiento de iones y tránsitos rotacionales, pero no causa cambios en la estructura molecular [462,508,509].

La transformación de energía electromagnética en energía calorífica tiene lugar mediante dos mecanismos, la conducción iónica y la rotación dipolar. La conducción iónica se produce por la migración electroforética de iones, cuando se aplica un campo electromagnético. La resistencia de la disolución a este flujo de corriente origina pérdidas de energía, debidas a la fricción, que origina el calentamiento de la disolución. La rotación dipolar está relacionada con el movimiento que sufren las moléculas con momentos dipolares (permanentes o instantáneos), cuando se someten a un campo eléctrico, puesto que tienden a alinearse con el mismo. Cuando deja de aplicarse el campo eléctrico, se restaura el desorden molecular, y se producen múltiples colisiones debidas a la agitación térmica, generando energía que se libera en forma de calor. A 2450 MHz, frecuencia utilizada en los aparatos comerciales, el proceso orden-desorden tiene lugar aproximadamente 5×10^9 veces por segundo, dando lugar a un calentamiento muy rápido [508,509].

La energía absorbida depende del factor de disipación ($\tan \delta$), que se define como el cociente de la pérdida dieléctrica de la muestra ϵ'' y la constante dieléctrica ϵ' . ϵ'' expresa la eficiencia de la transformación de la energía electromagnética en calor, y ϵ' expresa la capacidad de una molécula para ser polarizada mediante un campo eléctrico [508-510].

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

La energía absorbida por una muestra aumenta con el factor de disipación.

2.2.4.1.2. Mecanismo de extracción con disolventes

La extracción asistida por microondas se basa en el uso de energía de microondas para conseguir que los compuestos de interés, pasen de la muestra (generalmente sólida) a un disolvente.

El calentamiento por acción de la radiación de microondas, puede ocurrir por tres mecanismos [510], dependiendo de si se utiliza:

- Un disolvente o mezcla de disolventes que presenten coeficientes de pérdida dieléctrica altos.
- Una mezcla de disolventes con alta y baja polaridad dieléctrica.
- La muestra tiene una pérdida dieléctrica alta en un disolvente de pérdida dieléctrica baja.

La naturaleza de la muestra y el disolvente, juegan un papel fundamental en el proceso de extracción.

En las extracciones realizadas con disolventes o mezcla de disolventes polares, el calentamiento ocurre por rotación de dipolos. Estos disolventes se caracterizan por tener elevados coeficientes de pérdida dieléctrica, lo que origina una temperatura elevada. Las altas temperaturas alcanzadas por el disolvente, aumentan la solubilidad del analito y aceleran la cinética de la desorción. Si la extracción se lleva a cabo con disolventes transparentes a la energía de microondas (coeficiente de pérdida dieléctrica bajo), que actúan únicamente como medio solubilizador de los analitos, las muestras suelen ser materiales biológicos o ambientales, caracterizados por un elevado contenido en agua libre dispersada en su estructura. El agua presente en los tejidos provoca un sobrecalentamiento en determinados puntos de la matriz y extrae los analitos solubilizándolos [462].

Instrumentación

Las primeras aplicaciones de MAE se llevaron a cabo utilizando hornos microondas domésticos. Sin embargo, la aplicación de energía microondas a disolventes orgánicos inflamables constituye un serio riesgo, que ha derivado en el desarrollo de equipos adecuados para este tipo de aplicaciones.

Los extractores utilizados para la extracción con microondas pueden clasificarse en dos grandes grupos. Por un lado nos encontramos con sistemas multimodo, en los que la radiación de microondas se dispersa en una cavidad en la que se encuentra la muestra, y por otro, sistemas de enfoque, en los que la energía incide sólo sobre la zona en la que se sitúa la muestra, sometida a un campo electromagnético más intenso que en el caso previo.

Los sistemas multimodo, utilizan vasos cerrados, donde el disolvente puede calentarse por encima de su punto de ebullición, mejorando la velocidad de extracción y la eficiencia. Además, este sistema consta de varios vasos de extracción, que permiten procesar varias muestras simultáneamente, y ofrece la posibilidad de controlar la temperatura durante el proceso. Los



Figura II.12 Horno microondas multimodo

sistemas de enfoque, trabajan a presión atmosférica en una celda abierta, y como consecuencia, la temperatura máxima está determinada por el punto de ebullición del disolvente. Lleva un sistema de reflujo en el vaso abierto, sometido a radiación continua cuya potencia puede ser modulada fijando el porcentaje de potencia durante la extracción. Estos sistemas utilizan un sistema de enfoque de la radiación de microondas, por lo que el calentamiento de las muestras es homogéneo y muy eficiente [508-510].

2.2.4.2. Variables que afectan al proceso de extracción

La naturaleza y volumen de disolvente, la temperatura, el tiempo de extracción y la naturaleza de la matriz, son las principales variables a tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de MAE [508-510]. En muchas de las aplicaciones, se opta por diseños experimentales factoriales o central compuestos, para encontrar las condiciones más favorables. En otros casos, se opta por la optimización clásica mediante prueba y error.

La correcta elección del **disolvente** es fundamental para obtener un proceso de extracción óptimo. La selección del disolvente debe realizarse en base a tres premisas fundamentales. En primer lugar, hay que tener en cuenta las propiedades de los disolventes frente a las microondas. En el apartado anterior (**2.2.4.1.1**) ya se ha comentado que la absorción de microondas es proporcional a

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

la constante dieléctrica del disolvente (ϵ'), y la conversión de esta energía en calor depende del factor de pérdida dieléctrica (ϵ''). Por lo tanto, la eficiencia del calentamiento se expresa mediante el factor de disipación ($\tan \delta$). En la práctica, generalmente se considera que la absorción es proporcional a la polaridad del disolvente. Las moléculas polares y las disoluciones iónicas absorberán fuertemente energía de microondas, ya que presentan un momento dipolar permanente. Sin embargo, disolventes no polares, como hexano, no se calentarán cuando se expongan a microondas. En la tabla II.12, se recogen algunos parámetros físicos, incluyendo las constantes dieléctricas y los factores de disipación de algunos de los disolventes más comunes, utilizados en MAE.

Tabla II.12 Permitividad dieléctrica y factores de disipación para algunos de los disolventes utilizados en MAE (3 GHz, 25 °C) [511].

Disolvente	ϵ'	ϵ''	$\tan \delta \times 10^4$
Acetato de etilo	6.02	3.2	5312
Acetona	21.1	11.5	5555
Acetonitrilo	37.5	2.3	620
Agua	76.7	12.0419	15700
Etanol	24.3	1.625	2500
Heptano	1.9	1.9×10^{-4}	1
Metanol	23.9	15.296	6400
NaCl (ac.) 0.1 M	75.5	18.12	2400
Tetracloruro de carbono	2.2	8.8×10^{-4}	4

El segundo aspecto a tener en cuenta, es la interacción del disolvente con la matriz. Es importante que el disolvente presente la capacidad de penetrar en los poros de la matriz, a la hora de conseguir extracciones cuantitativas. Finalmente, un tercer aspecto a considerar, es la solubilidad de los analitos en el disolvente. El disolvente debería presentar alta selectividad, por los analitos de interés excluyendo las sustancias indeseadas de los componentes de la matriz.

En cuanto al **volúmen de disolvente**, éste debe ser el suficiente para asegurar que toda la muestra esté inmersa en el mismo. Generalmente varía entre 10 y 30 mL, pero depende en gran medida del tipo y tamaño de muestra [510].

La **temperatura** es el parámetro más investigado en MAE, puesto que es un factor que afecta de manera importante a la eficiencia de la extracción. Cuando MAE se lleva a cabo en vasos cerrados, pueden utilizarse temperaturas superiores al punto de ebullición del disolvente. Estas elevadas temperaturas mejoran la eficiencia de extracción, ya que favorece la desorción de los analitos de los sitios

activos de la matriz. Además, los disolventes incrementan su capacidad para solubilizar los analitos, al mismo tiempo que disminuye la tensión superficial y la viscosidad, favoreciendo la penetración del disolvente en la matriz.

El **tiempo de extracción** generalmente presenta un efecto positivo en la extracción. Sin embargo, esto no se traduce en tiempos de extracción infinitamente largos, ya que a partir de cierto momento este parámetro deja de afectar al sistema. En el caso de compuestos termolábiles, tiempos de extracción prolongados favorecen la degradación.

Finalmente, destacar que la **naturaleza de la matriz** y el contenido en humedad de la misma, también influyen en el sistema de extracción. Las moléculas de agua presentan un momento dipolar elevado, y absorben energía de microondas, favoreciendo el calentamiento de la muestra. Es importante controlar el contenido de humedad para obtener resultados reproducibles. Por otro lado, la naturaleza de la muestra es determinante a la hora de obtener extracciones más o menos selectivas.

2.2.4.3. Aplicaciones de MAE

El interés de la extracción asistida por microondas se ha incrementado en los últimos años, y muchos laboratorios han estudiado las posibilidades analíticas de esta nueva técnica, aplicada a la extracción de compuestos orgánicos. Las aplicaciones de la extracción asistida por microondas se han centrado fundamentalmente en matrices sólidas de diversa naturaleza, tales como alimentos, materiales biológicos, suelos, sedimentos, partículas atmosféricas, etc. En estas matrices se han extraído grasas, vitaminas, productos naturales, contaminantes como pesticidas, fenoles, PAHs, PCBs, compuestos organometálicos, etc. También se ha utilizado la energía de microondas para la extracción de diferentes compuestos en muestras líquidas, como agua, vinos, leche, etc [462,494,509,510,512-515].

Teniendo en cuenta la enorme cantidad de aplicaciones existentes, en este apartado, nos centraremos en las metodologías desarrolladas para la extracción de PAHs en muestras sólidas (tabla II.13).

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

En 1994, López-Avila y col. [516] presentaron la primera publicación en la que se aplica MAE, para la extracción de varios tipos de contaminantes orgánicos persistentes (PAHs, fenoles y pesticidas organoclorados) en suelos. La extracción se realiza con hexano-acetona (1:1) y se estudian las recuperaciones a diferentes temperaturas y tiempos. En este estudio se demuestra que las recuperaciones de los PAHs incrementan de 70 a 75% cuando se incrementa la temperatura de 80 a 115 °C. Sin embargo, un incremento de la temperatura a 145 °C no mejora la eficiencia de la extracción. Además se demostró que 5 o 10 min son suficientes, para la extracción de la mayoría de los compuestos investigados.

Pastor y col. [517] proponen un método donde se utiliza una mezcla de tolueno-agua (10:1) para la extracción de PAHs, DDTs y PCBs en sedimentos, pero según sus datos, las diferencias en las recuperaciones, cuando se utiliza este disolvente son muy pequeñas si se comparan con las obtenidas mediante hexano-acetona (1:1, v/v).

Por su parte Pino y col. [518] optan por un medio micelar (0.02 M de polioxietileno 10 lauril éter) para la extracción de PAHs en sedimentos marinos, que parece ser una alternativa viable ya que permite la extracción selectiva de los analitos de interés.

Tabla II.13 Aplicaciones de MAE para la extracción de PAHs de diferentes matrices sólidas.

Matriz	Muestra (g)	Disolvente	T ^a (°C)	t _{ext} (min)	R (%)	Ref.
Aceite	1	35 mL KOH (MeOH) 1.5 M	130	10	84-103	[519]
Carne ahumada	2	20 mL Hex	115	15	77-103	[520]
Carne ahumada	0.4	20 mL Hex	120	20	75-103	[521]
Galletas	5	10 mL Hex-Ace (1:1)	---	9	86-110	[522]
Hojas de picea	5	50 mL Hex-Ace (3:2)	140	20	92-171	[523]
Hojas de pino	---	90 mL Hex-DCM (1:1)	---	30	70-130	[524]
Lodo	1	30 mL Hex-Ace (1:1)	---	10	56-75	[525]
Lodo	1	60 mL Ace-Tol (1:1)	---	20	58-89	[470]
Lodo	0.5	20 mL Hex-Ace (1:1)	---	2	69-110	[526]
Lombrices	1	20 mL iPrOH-Ciclohex (1:1)	115	10	65-110	[527]
Madera	4	30 mL AcN	120	15	91-109	[528]
Mejillón	0.5	30 mL Hex-Ace (1:1)	130	20	---	[529]
Partic. atm	0.01-0.05	20 mL Ace	80	10	---	[530]
Partic. atm	---	30 mL AcN	110	20	62-112	[531]
Partic. atm	---	20 mL Hex-Ace (1:1)	---	20	79-122	[532]
Partic. atm	---	20 mL Ace-Tol (5:95)	---	20	77-116	[533]
Pescado ahumado	0.4	20 mL Hex	120	20	78-108	[521]
Polen	5	50 mL Hex-Ace (3:2)	140	20	119-192	[523]
Sedimento		30 mL Hex-Ace (1:1)	115	5	75-137	[534]
Sedimento	2	10 mL Tol-H ₂ O (10:1)	---	6	97-107	[517]
Sedimento	0.25	20 mL Ace-Ciclohex (2:3)	80	15	97	[535]
Sedimento	1	15 mL Ace	---	15	---	[536]
Sedimento	5	30 mL KOH (MeOH) 1M	150	30	36-118	[537]
Sedimento	5	30 mL DCM-Ace Et (1:1)	150	30	51-84	[538]
Sedimento marino	6	30 mL Hex-Ace (1:1)	120	15	52-164	[539]
Sedimento marino	1.5	15 mL Hex-Ace (1:1)	---	6	92-105	[540]
Sedimento marino	1	25 mL Hex-Ace (1:1)	110	10	47-102	[541]
Sedimento marino	0.8	10 mL POLE 0.02 M	---	5	86-101	[518]
Suelo	0.1-1	30 mL DCM	---	10	85-106	[542]
Suelo	5	30 mL Ace	115	15	80-100	[543]
Suelo	0.1-1	3 mL AcN	---	10	98-99	[544]
Suelo	5	30 mL Hex-Ace (1:1)	115	10	65-115	[516]
Suelo	3-6	22 mL NMP	130	60	117	[545]
Suelo	2	40 mL Ace	120	20	75-105	[546]
Suelo	1	20 mL Hex-Ace (1:1)	---	10	78-130	[547]
Suelo	5	25 mL Hex-Ace (1:1)	110	10	61-126	[474]
Suelo	1	10 mg fibra grafito	50	20	---	[548]
Suelo	5	30 mL Hex-Ace (1:1)	115	10	47-111	[549]

t_{ext}, tiempo de extracción; R, recuperaciones; Part. atm, partículas atmosféricas; KOH (MeOH), disolución de hidróxido potásico en metanol; Hex, n-hexano; Hex-Ace, n-hexano-acetona; Hex-DCM, n-hexano-diclorometano; Ace-Tol, acetona-tolueno; iPrOH-Ciclohex, 2-propanol-ciclohexano; AcN, acetonitrilo; Ace, acetona; Tol-H₂O, tolueno-agua; Ace-Ciclohex, acetona-ciclohexano; DCM-Ace Et, diclorometano-acetato de etilo; POLE, polioxietileno 10 lauril éter; DCM, diclorometano; NMP, N-metil-2-pirrolidina; --- información no disponible en la publicación. Las mezclas de disolventes están referidas a v/v.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Por su parte, Xu y col. [548] han desarrollado una metodología basada en el uso de un adsorbente sólido como medio extractante. Por primera vez, utilizan fibra de grafito para llevar a cabo la extracción de PAHs de muestras de suelo. Se introduce la muestra de suelo en el vaso de extracción, se añaden 10 mL de agua, y la fibra de carbono. La extracción tiene lugar a 50 °C durante 20 min. Tras la etapa de extracción, se retira la fibra de carbono y se enjuaga con agua ultrapura. La desorción de los analitos se realiza con 150 µL de acetonitrilo, en un baño de ultrasonidos durante 5 min. Cuando se combina con MAE, este material muestra excelente capacidad de extracción para los PAHs.

Los tiempos de extracción más habituales se encuentran entre 5-30 min, por lo que se trata de una técnica relativamente rápida, con un consumo moderado de disolventes. Por otro lado, gran parte de las aplicaciones desarrolladas, utilizan la extracción Soxhlet como método de referencia, y en la mayoría de ellas se demuestra que MAE proporciona recuperaciones del mismo orden, o incluso superiores. El gran inconveniente de esta técnica, es que generalmente, tras la etapa de extracción, se requiere de una etapa de centrifugación y de una o varias etapas de purificación de los extractos resultantes.

2.2.5. EXTRACCIÓN CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

La **extracción con líquidos presurizados** (pressurized liquid extraction, PLE), también conocida como extracción con fluidos presurizados (PFE), o por el nombre comercial, extracción acelerada por disolventes (ASE TM, Dionex, Sunnyvale, CA, USA), es una técnica de preparación de muestra, que combina la extracción con disolventes a temperaturas (50-200 °C) y presiones elevadas (10-20 MPa). El uso simultáneo de presiones y temperaturas elevadas, conduce a procesos de extracción más rápidos que los procedimientos clásicos, utilizando volúmenes inferiores de disolventes. Se trata además, de una técnica altamente automatizada, por lo que es especialmente útil a la hora de realizar análisis de rutina [550,551].

2.2.5.1. Principios de la técnica

2.2.5.1.1. Consideraciones físico-químicas

La utilización de disolventes líquidos a temperaturas y presiones elevadas mejora el rendimiento de las extracciones, frente a las realizadas a temperatura y presión atmosféricas, debido fundamentalmente a los efectos en la solubilidad y la transferencia de masa y la ruptura del equilibrio superficial [462,550,551].

1. Efectos sobre la solubilidad y la transferencia de masa

- El uso de elevadas temperaturas incrementa la capacidad de los disolventes para solubilizar los analitos de interés.
- El incremento de la temperatura produce un incremento en las velocidades de difusión.
- Si durante la etapa de extracción estática se introduce disolvente fresco, se favorece la transferencia de masa, incrementando la velocidad de extracción.

2. Ruptura del equilibrio superficial

- Efecto de la temperatura: Un incremento de la temperatura favorece la ruptura de las fuertes interacciones soluto-matriz, originadas por enlaces de Van der Waals, enlaces de hidrógeno, e interacciones dipolares entre las moléculas de soluto y los sitios activos de la matriz. Además, temperaturas elevadas pueden disminuir la viscosidad de los disolventes, permitiendo una mejor penetración del mismo en las partículas de la matriz y, por tanto, mejorando la extracción. Una disminución de la tensión superficial del disolvente permitirá que los analitos se disuelvan más fácilmente en el disolvente de extracción.
- Efecto de la presión: Si durante las extracciones se ejerce una presión suficiente sobre el disolvente, pueden utilizarse temperaturas superiores al punto de ebullición de los mismos, manteniendo en todo momento el disolvente en estado líquido. Por otro lado, el uso de presiones elevadas facilita la extracción de la muestra cuando los analitos permanecen

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

atrapados en los poros de la matriz. La presión fuerza al disolvente a entrar en contacto con áreas de la matriz que no serían accesibles cuando se utilizan condiciones atmosféricas. El uso de elevadas presiones forzará al disolvente a entrar en contacto con los analitos de los poros de la matriz. Por otro lado, los flujos presurizados también ayudan a la solubilización de burbujas de aire, de manera que el disolvente pueda entrar en contacto más rápidamente con la matriz de la muestra.

La desorción de los analitos de las muestras sólidas puede describirse por los procedimientos representados en la figura II.13 [551]. Se pueden diferenciar tres procesos diferentes, que controlan el transporte de los analitos desde la matriz hasta el seno del disolvente durante la extracción: desorción desde una partícula sólida, difusión a través del disolvente localizado en el interior del poro de la partícula, y transferencia hacia el seno del flujo de disolvente (solubilización).

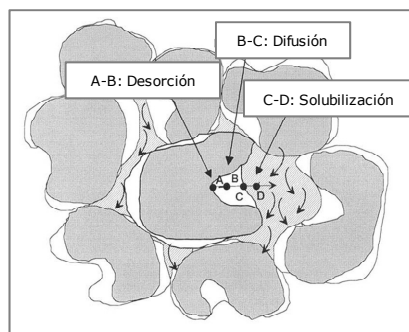


Figura II.13 Representación de los procesos que tienen lugar durante la extracción.

2.2.5.1.2. Mecanismo de extracción con disolventes

Un procedimiento típico de PLE consta de una serie de **etapas**, que se describen a continuación.

La preparación de muestra es una etapa esencial en todos los procedimientos de extracción con disolventes [551-553]. Mientras muchos tipos de muestras, pueden extraerse sin ningún pretratamiento, otras requieren de alguna manipulación para que tenga lugar una extracción eficiente. La difusión de los analitos de la muestra hacia el disolvente, puede incrementarse notablemente con la reducción del tamaño de partícula, y evitando la agregación de las partículas de la muestra. Por ello, el proceso de PLE a menudo requiere de dispersión de la muestra con un material inerte como arena o tierra de diatomea. El secado de la muestra también es importante, especialmente, cuando se lleva a cabo la extracción de analitos apolares, utilizando disolventes apolares. Generalmente, agentes desecantes, como celulosa, sulfato sódico anhidro o tierra de diatomea,

son empleados con este propósito. Otras alternativas son secado mediante hornos de vacío o liofilización, aunque estos no se recomiendan en el caso de extracción de compuestos volátiles. El uso de mezclas de disolventes polares y no polares (hexano-acetona, hexano-acetonitrilo, etc) pueden resultar adecuados para la extracción de muestras húmedas, haciendo que la etapa de secado no sea crucial.

Una vez que la muestra ha sido sometida a los pretratamientos oportunos, ésta se transfiere a la celda de extracción. Para evitar la obturación del sistema, es habitual colocar filtros de celulosa o de fibra de vidrio en los extremos de la celda. También es recomendable rellenar la celda con matrices inertes (arena, tierra de diatomea, etc.) para reducir el volumen muerto.

La celda se coloca en el sistema de PLE y posteriormente se carga en el horno. Se puede operar en dos modos diferentes, precalentamiento (preheat) o prellenado (prefill). En el modo de precalentamiento, el horno se calienta hasta la temperatura apropiada y, a continuación, la celda se carga en el horno. Después del tiempo necesario, el disolvente se introduce en la celda y comienza el proceso de extracción. En el modo de prellenado, la celda se llena con el disolvente, y posteriormente se carga en el horno. El modo de prellenado es recomendable para la extracción de compuestos termolábiles.

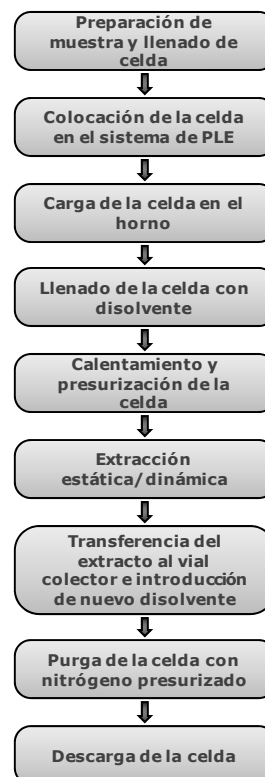


Figura II. 14 Etapas de un procedimiento de PLE.

El proceso de extracción puede realizarse en modo estático o en modo dinámico. En la extracción estática, la celda se introduce en el horno a la temperatura de extracción, se rellena con disolvente y se presuriza. Tras un cierto intervalo de tiempo (tiempo de equilibración), alcanza la temperatura deseada y se mantiene esa temperatura durante un tiempo controlado (tiempo de extracción estática). Se pueden efectuar uno o varios ciclos de extracción estática. A continuación, se abre la válvula estática y se recoge el disolvente en el vial de extracción. Posteriormente, la celda y los tubos conectores se enjuagan con un volumen de disolvente fresco (flush volume), que viene expresado como tanto por ciento del volumen de celda. Finalmente, todo el sistema se purga con nitrógeno

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

presurizado (1-2 min). El objetivo de estos dos últimos pasos es, por una parte, eliminar en la medida de lo posible todos los residuos de la muestra para mejorar la recuperación de los analitos, y por otra parte, preparar el sistema para el siguiente proceso de extracción. No obstante, cabe destacar que una alternativa muy útil para este fin, es la introducción de lavados entre muestras.

El modo dinámico se lleva a cabo mediante el bombeo continuo de disolvente presurizado a través de la celda a un flujo constante durante un tiempo determinado. El contacto continuo entre la muestra y porciones frescas de disolvente acelera la transferencia de masa, mejorando la eficacia de la extracción y reduciendo el tiempo de extracción. Sin embargo, este tipo de extracción apenas se utiliza, principalmente debido al elevado consumo de disolvente, en comparación con el modo estático, así como a la ausencia de un equipo disponible comercialmente.

Instrumentación

En la actualidad, existen varios equipos comerciales disponibles, aunque la mayoría de las aplicaciones de PLE, han utilizado el extractor ASE 200 (figura II.15), de la casa comercial Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Este sistema permite trabajar a temperaturas de hasta 200 °C y presiones de hasta 21 MPa, en celdas de extracción de diferentes volúmenes (1, 5, 11, 22, 33 mL).

Además consta de un carrusel donde se pueden colocar hasta 24 celdas y 26 viales para la recogida de extractos, de modo que ofrece la posibilidad de procesar un número elevado de muestras de manera secuencial. No obstante, cabe mencionar que algunas de las aplicaciones se han desarrollado mediante dispositivos no comerciales.



Figura II. 15 Equipo de extracción ASE 200.

La figura II.16 muestra el esquema de un extractor con disolventes presurizados. El extractor consta de cuatro recipientes para disolventes y una bomba encargada de transferir los disolventes a elevada presión hacia la celda de extracción. El sistema ofrece la posibilidad de realizar mezclas entre disolventes de manera automatizada, sin necesidad de prepararlas previamente. Por otro lado, el horno, donde se alojan las celdas de extracción, es el encargado de conferir al sistema temperaturas elevadas. El equipo incorpora un sistema automático que coloca las celdas en el horno, y después de la extracción, las devuelve al carrusel de celdas. Finalmente, consta de viales de recogida, donde se transfieren los extractos resultantes. El sistema se purga normalmente con nitrógeno.

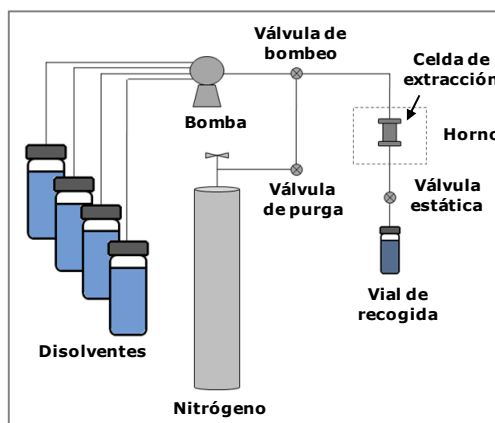


Figura II. 16 Esquema de un sistema de PLE.

2.2.5.2. Variables que afectan al proceso de extracción

El disolvente, la temperatura y el tiempo son los parámetros más influyentes en el proceso de extracción. El volumen de disolvente y el número de ciclos también pueden afectar a la eficiencia de extracción, aunque normalmente en menor medida.

La optimización del proceso de extracción, generalmente empieza con la elección del **disolvente**. En PLE pueden utilizarse un gran rango de disolventes, excepto aquellos para los cuales la temperatura de ignición oscile entre 40-200 °C (p. ej. disulfuro de carbono, dietil éter y 1,4-dioxano), o aquellos que se caracterizan por su naturaleza corrosiva, como ácidos y bases fuertes.

La extracción de muestras sólidas, que contienen mezclas de diferentes especies, a diferentes niveles de concentración, es una tarea complicada. A temperaturas y presiones elevadas, la selectividad de la extracción disminuye, puesto que se extraen sustancias no deseadas junto con los analitos de interés [551]. Por ello, el disolvente deberá seleccionarse de tal modo que presente afinidad por los analitos, minimizando la extracción de otros componentes de la

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

matriz. Así, la polaridad del mismo debería ser cercana a la polaridad de los analitos de interés. Disolventes no polares e inmiscibles en agua (hexano, pentano, etc), o una mezcla de disolventes de baja y media polaridad (pentano-diclorometano, ciclohexano-acetato de etilo, etc), se utilizan frecuentemente para la extracción de compuestos apolares y lipofílicos. Disolventes más polares, como acetonitrilo, metanol, acetato de etilo o agua, se emplean normalmente para la extracción de contaminantes polares o hidrofílicos [552,554].

La **temperatura** es la variable de mayor importancia en este tipo de extracciones. En el apartado anterior (**2.2.5.1.1**) se han explicado en detalle los efectos de la temperatura y la presión en el proceso de extracción. Como se ha mencionado previamente, el incremento de la temperatura favorece la extracción de los analitos de la matriz de la muestra, incrementando la velocidad de extracción y mejorando la eficiencia de la misma.

La **presión** juega un papel fundamental a la hora de mantener el disolvente en estado líquido. Además, tal y como se ha mencionado anteriormente, las presiones elevadas favorecen el contacto del disolvente, con los analitos contenidos en los poros de la matriz. Sin embargo, diversos estudios [555-559] han demostrado que no es una variable crítica. Generalmente, variaciones en la presión no conducen a mejoras en la recuperación de los analitos.

Los **tiempos de extracción** son muy cortos, si se comparan con las técnicas tradicionales, ya que generalmente oscilan entre 5-10 min. El efecto del tiempo de extracción debe evaluarse siempre en conjunción con el **número de ciclos**, puesto que diferentes estudios han encontrado mejores resultados utilizando varias extracciones estáticas consecutivas a tiempos cortos, que una única etapa de extracción más larga. Por otro lado, mediante el uso de ciclos estáticos, se introduce **disolvente fresco** durante el proceso de extracción (flush volume), lo que favorece la transferencia de masa de los analitos hacia el disolvente, y generalmente conduce a extracciones más eficientes [552,554].

Finalmente, el **tiempo de purga** controla el periodo durante el cual se pasa nitrógeno a través de la celda de extracción. Este parámetro no suele afectar a la recuperación de los analitos, y su papel fundamental es arrastrar los residuos de disolvente hacia el vial colector, y dejar el sistema preparado para la siguiente extracción.

2.2.5.3. Aplicaciones de PLE

Desde su introducción en 1996 [550], la PLE se ha aplicado a la extracción de diversos contaminantes a partir de matrices medioambientales [554,560], alimentarias y biológicas [461,552]. Se ha demostrado que, en términos de recuperación y precisión, esta técnica es equivalente o superior a otras metodologías. De hecho, la EPA propone esta técnica para la extracción de compuestos volátiles y semivolátiles en matrices sólidas medioambientales, en su método 3545A [561].

Existen multitud de publicaciones relacionadas con esta técnica, de modo que sería inviable presentar todas, o gran parte de ellas en esta memoria. Por lo tanto, al igual que en el apartado dedicado a MAE, nos centraremos fundamentalmente, en las aplicaciones relacionadas con los analitos estudiados en esta Tesis Doctoral.

PLE ha sido utilizada para la extracción de PAHs de una gran variedad de matrices, incluyendo sedimentos, suelos, materia particulada aérea, partículas diesel, ceniza, polvo doméstico y tejidos biológicos (tabla II.14). En general, PLE es una técnica efectiva para la extracción de estas matrices, produciendo resultados similares a los obtenidos mediante la extracción Soxhlet. Schantz y col. [553] encontraron que la PLE, utilizando diclorometano, tolueno o una mezcla de tolueno-metanol (1:1, v/v), a 100 °C y 13.8 MPa mostraba mejores eficiencias de extracción, que la extracción Soxhlet, para los PAHs de masa molecular entre 276 y 278 en materia particulada diesel (SRM 1650 y SRM 2975).

Martínez y col. [309] han publicado la extracción de PAHs de mejillones mediante PLE con recuperaciones entre 65-150%, utilizando hexano-diclorometano (1:1, v/v) a presión de 10 MPa y temperatura de 150 °C. Jánská y col. [562] optaron por hexano-acetona (1:1, v/v), como disolvente de extracción más adecuado para la extracción de PAHs de tejido de pescado y hojas de picea mediante PLE. Los autores obtienen buenas recuperaciones, y no se encontraron diferencias significativas con las obtenidas mediante Soxhlet y USE. Liguori y col. [563] también han aplicado PLE para la extracción de PAHs de mejillón azul, filete de salmón, aceite de pescado y pienso para pescado, utilizando diclorometano como disolvente (10 MPa, 100 °C). Las recuperaciones oscilaron entre 75-121%

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

para las muestras con adición, y el método fue validado utilizando dos materiales de referencia certificados (CRM2977, tejido de mejillón; T0621, aceite de oliva).

Trably y col. [564] proponen un método para la extracción selectiva de PAHs de muestras de lodo mediante PLE. El procedimiento se basa en la introducción de 1 g de alúmina en el interior de la celda de extracción, justo por debajo de la muestra. La extracción se realiza utilizando hexano-acetona (1:1, v/v) como disolvente, a 120 °C y 10 MPa. Trabajando en estas condiciones, consiguen llevar a cabo la extracción y la limpieza en una sola etapa, y recuperaciones satisfactorias para la mayoría de los analitos (excepto el naftaleno que se pierde en la etapa de evaporación del disolvente).

Un aspecto importante a considerar, es la posibilidad de que los blancos de extracción obtenidos mediante PLE presenten interferencias, que compliquen la determinación de los analitos de interés. Normalmente, estos problemas están asociados a problemas de contaminación de las celdas de extracción. Una solución a este problema, es realizar una extracción previa de la celda vacía, en las mismas condiciones que las utilizadas para la extracción de la muestra [565]. Como se comenta más adelante, en el capítulo de resultados y discusión, otra posibilidad es utilizar una etapa de limpieza de las celdas mediante sonicación con hexano-acetona (1:1, v/v), durante 15 min.

Tabla II.14 Aplicaciones de PLE para la extracción de PAHs de matrices sólidas medioambientales.

Matriz	Disolvente	Tª (°C)	P (MPa)	t _{ext} (min)	Ciclos	Flush (%)	R (%)	Ref
Café	Hex-Ace (1:1)	150	---	5	3	140	70-106	[566]
Carne ah.	Hex	100	10	10	2	60	75-110	[567]
Cerdo	DCM-AcN (9:1)	100	10	5	1	60	54-102	[568]
Compost	Hex-Ace (1:3)	140	10	5	3	50	85-99	[569]
Hojas pino	Hex	120	15	10	3	---	---	[570]
Lodo	Hex-DCM (1:1)	100	10	3	3	60	60-93	[182]
Lodo	Hex-Ace (1:1)	100	14	5	1	70	---	[525]
Lodo	Hex-Ace (1:1)	120	10	5	2	60	94-115	[564]
Part. atm	Hex-Ace (7:3)	150	10	5	2	60	60-100	[571]
Part. atm	Hex-Ace (1:1)	100	10	5	1	---	60-103	[572]
Part. atm	Tol	150	14	5	3	70	64-102	[573]
Part. atm	Hex-Ace (1:1)	120	10	5	2	60	96-103	[574]
Part. diesel	Tol-MeOH (1:1)	100	14	5	1	---	---	[553]
Part. mar	Hex-Ace (1:1)	100	14	5	1	---	97-108	[575]
Biol. mar	DCM	100	10	5	2	115	75-121	[563]
Mejillón	Hex-DCM (1:1)	150	10	10	2	---	65-150	[309]
Mejillón	DCM-Ace (1:1)	125	10	5	1	60	70-110	[576]
Sedimento	Tol	150	15	10	2	---	---	[577]
Sedimento	Hex	200	---	60	---	---	---	[578]
Sedimento	H ₂ O-MeOH (9:1)	200	13.8	10	1	---	---	[579]
Suelo	DCM-Ace (1:1)	140	10	5	1	50	70-112	[474]
Suelo	Ciclohex-DCM (9:1)	120	14	5	2	100	55-91	[580]
Suelo	Hex	150	10	5	1	60	35-110	[486]
Suelo	Ace-Tol (1:1)	90	14	5	1	---	---	[581]
Suelo	DCM-Ace (1:1)	100	13.8	15	1	---	---	[582]
Suelo	Hex-Ace-Tol (10:5:1)	100	13.8	10	1	60	---	[583]
Suelo	DCM-Ace (1:1)	100	7	30	1	---	---	[584]
Suelo	DCM-Ace (1:1)	100	13.8	5	1	---	---	[546]
Suelo	Hex-Ace (1:1)	140	15	10	3	---	---	[585]
Turba	Hex-Ace (2:1)	120	14	6	2	60	69-89	[586]
Trucha	Hex-Ace (1:1)	100	10	5	1	---	---	[562]

t_{ext}, tiempo de extracción estático; flush, disolvente fresco expresado como porcentaje del volumen de celda; R, recuperación; Hex-Ace, hexano-acetona; carne ah., carne ahumada; cerdo, carne de cerdo; Hex, n-hexano; DCM-AcN, diclorometano-acetonitrilo; Hex-DCM, hexano-diclorometano; Part. atm, partículas atmosféricas; Tol, tolueno; Part. diesel, materia particulada de motores diesel; Biol. mar, matrices biológicas de origen marino; DCM, diclorometano; DCM-Ace, diclorometano-acetona; Ciclohex-DCM, ciclohexano-diclorometano; Ace-Tol, acetona-tolueno; Hex-Ace-Tol, hexano-acetona-tolueno; ---, información no disponible en la publicación. Las mezclas de disolventes están referidas a v/v.

La PLE es una técnica relativamente rápida y automatizada, que puede resultar especialmente útil para el análisis de rutina de muestras medioambientales y alimentos. La posibilidad de controlar los parámetros de extracción, produce resultados altamente reproducibles. Algunas limitaciones son, el elevado coste del equipo, la etapa de preparación de las celdas, que a menudo resulta laboriosa y se consume disolvente en su lavado, y la baja selectividad del proceso, que conlleva

etapas de limpieza de los extractos antes de su análisis [551]. No obstante, esta última limitación es cada vez menos acusada, ya que en las últimas aplicaciones desarrolladas, se ha optado por introducir sólidos adsorbentes en la celda, consiguiendo extracciones cada vez más selectivas.

2.2.6. DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA

En 1989, Barker y col. [587] introducen un nuevo procedimiento de preparación de muestra, mediante el cual se consigue la disrupción de la muestra y extracción de analitos de matrices sólidas o semisólidas, de manera simultánea. La **dispersión de la matriz en fase sólida** (matrix solid-phase dispersion, MSPD), combina aspectos de varias técnicas, para la disrupción de la muestra, y al mismo tiempo, genera un material que posee un carácter cromatográfico único, para la separación de los analitos de interés de una muestra dada. La MSPD ofrece además, la posibilidad de realizar un fraccionamiento completo de los componentes de la matriz, así como la capacidad de eluir selectivamente un único compuesto o varias clases de compuestos, de una misma muestra. La posibilidad de llevar a cabo la extracción y limpieza en una única etapa, conduce a una reducción del tiempo de análisis y del consumo de disolventes.

2.2.6.1. Principios de la técnica

Originalmente, la MSPD implicaba la mezcla de una muestra sólida o semisólida, con un soporte sólido de sílice, previamente derivatizado para producir en su superficie una fase orgánica enlazada (p. ej. C_{18}). Este soporte actúa como agente abrasivo, provocando la ruptura mecánica de la estructura de la matriz y consiguiendo su distribución sobre las partículas de adsorbente. Además, la presencia de una fase orgánica enlazada en el soporte sólido, proporciona una dimensión adicional al proceso, puesto que los componentes de la muestra se disuelven y dispersan en su superficie. Así, a través de las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas de los diferentes componentes de la muestra sobre la superficie de la fase enlazada, se produce una fase con características únicas, que permiten llevar a cabo la extracción del analito de interés [587,588,589].

En los últimos años, muchas aplicaciones de esta técnica han optado por la dispersión de la muestra con silicatos sin derivatizar (gel de sílice, arena, etc.)

[590-592] u otros sólidos inorgánicos (Florisil, alúmina, etc) [178,593-598] que también provocan la disrupción de la muestra, pero que no poseen, aparentemente, las mismas propiedades dispersivas que el C₁₈.

2.2.6.1.1. Etapas de la MSPD

El proceso de MSPD consta de las siguientes **etapas** (figura II.17) [599,600]:

- 1] Una muestra líquida, viscosa, semisólida o sólida se transfiere a un mortero de vidrio o ágata, y se mezcla con un agente dispersante con ayuda de la mano del mortero, hasta conseguir la completa disrupción y dispersión de la misma. Normalmente la relación muestra/adsorbente varía entre 1:1 y 1:4.
- 2] La mezcla se empaqueta en una columna que, o bien se encuentra vacía, o contiene una o varias capas de adsorbentes, si el procedimiento incluye una etapa de limpieza, simultánea a la extracción. La columna es normalmente el cuerpo de una jeringa o un cartucho de extracción en fase sólida con una frita de acero inoxidable o polipropileno, un filtro de celulosa o un tapón de lana de vidrio en su parte inferior. También se coloca una segunda frita o tapón sobre la mezcla para llevar a cabo la compresión de la misma. La introducción de la mezcla en la columna de separación sigue los principios de la cromatografía de adsorción convencional, por lo que deben evitarse la formación de canales en la columna, y el material no debe estar demasiado compactado, para permitir el flujo de disolvente a través del sistema.
- 3] La elución de los analitos de interés se lleva a cabo con un disolvente orgánico adecuado, mientras que las interferencias de la matriz son selectivamente retenidas en la columna. Otra posibilidad, es la elución de los compuestos interferentes en una etapa de lavado, mientras que los analitos de interés permanecen retenidos en la columna. A continuación, se cambia el disolvente de elución y se extraen los analitos. Puesto que la totalidad de la muestra está presente en la columna, también es posible llevar a cabo eluciones múltiples o secuenciales de dicha muestra. De esta forma, se pueden aislar diferentes grupos de compuestos presentes en una misma muestra. La mayoría de las eluciones se lleva a cabo por gravedad, aunque en algunos casos, se aplica un poco de presión para controlar el flujo del disolvente de elución.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los extractos resultantes se pueden analizar directamente, o ser sometidos a etapas de limpieza adicionales.

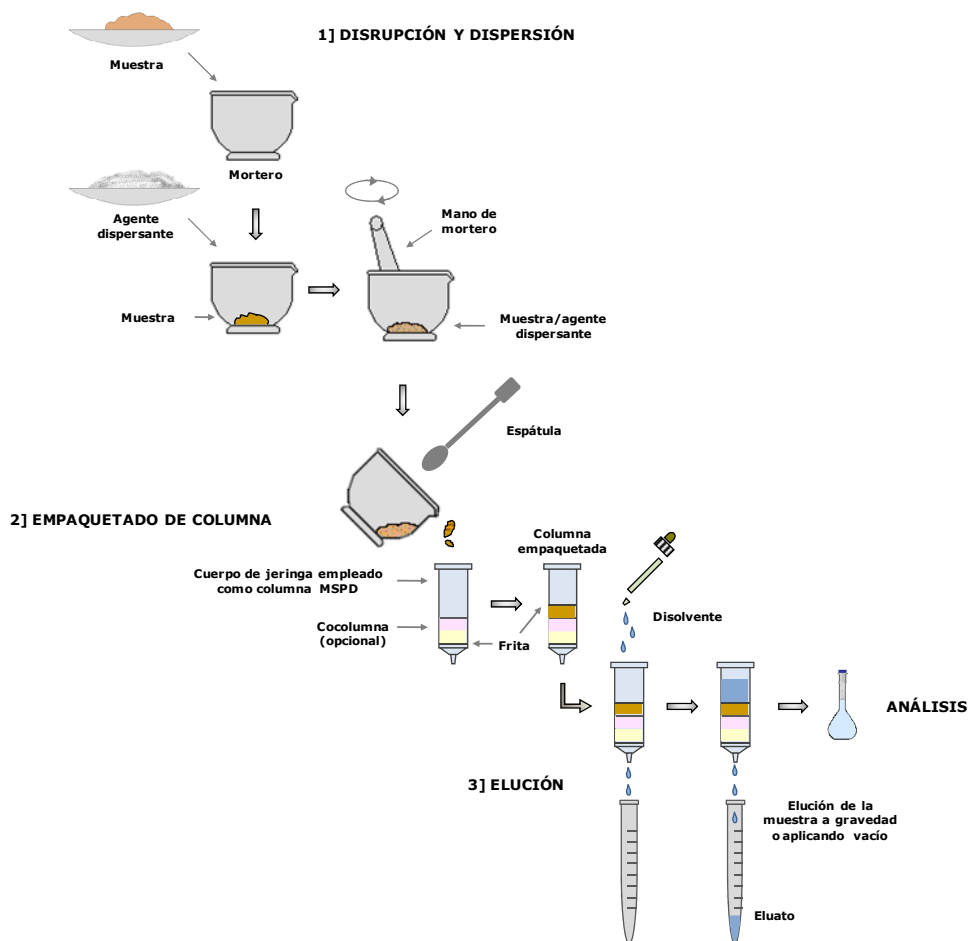


Figura II.17 Representación esquemática del proceso de MSPD.

2.2.6.2. Variables que afectan al proceso de extracción

La selectividad del proceso de MSPD depende de la combinación de **adsorbente y disolvente** utilizados [588,599-601]. Las aplicaciones clásicas de MSPD utilizan adsorbentes de fase reversa como dispersantes. C_{18} es el adsorbente más utilizado, aunque también se han utilizado materiales como C_8 y C_{30} . En algunas aplicaciones, el C_{18} es sustituido por aminopropil, puesto que el carácter de intercambiador aniónico de los materiales amino parece mejorar la selectividad,

cuando se utiliza para la extracción de muestras grasas complejas. Adsorbentes no enlazados de fase normal, como Florisil, alúmina y sílice, también han sido empleados como dispersantes en diversas metodologías de MSPD. Estos adsorbentes interactúan con los componentes de la muestra sólo por adsorción y, obviamente, no disuelven la matriz de la muestra. Las propiedades de adsorción de estos adsorbentes pueden ser ajustadas, dependiendo de su contenido en agua o su carácter ácido o básico. Otra tendencia es utilizar materiales inertes como arena, tierra de diatomea, o celita en el proceso de MSPD. Se trata de alternativas de menor coste, pero con una selectividad limitada, ya que está controlada por la solubilidad de los componentes de la matriz en el disolvente de elución. Más recientemente se han desarrollado algunas aplicaciones con dispersantes menos convencionales como fibras de carbono activado o polímeros de impresión molecular.

La elección del **disolvente de elución**, se lleva a cabo normalmente, en función de la polaridad de los analitos. Si se trata de analitos de baja polaridad, normalmente se utilizan disolventes apolares, como hexano, diclorometano, o mezclas de ambos; mientras que la elución de compuestos de polaridad elevada suele realizarse utilizando disolventes como acetonitrilo, acetona, acetato de etilo, agua o metanol. El volumen de disolvente, es función de la aplicación puesto que depende en gran medida de la cantidad de muestra y adsorbente utilizados.

La **naturaleza de la matriz** también afecta al proceso de extracción [588,599]. De hecho, en algunos casos es necesario alterar el estado de ionización de los componentes de la muestra, para asegurar la existencia de interacciones con la fase enlazada del soporte sólido y/o el disolvente de elución. Así, varios estudios han demostrado que la adición de agentes quelatantes, ácidos, bases, antioxidantes, etc. a la muestra durante la etapa de mezcla, afecta a la dispersión y elución de los analitos de la muestra.

Otro parámetro que afecta a la selectividad del proceso, es la introducción de una **etapa de limpieza** en el sistema. En algunos casos, la elección de un agente dispersante y un disolvente adecuados, no es suficiente para conseguir extractos directamente analizables. Una alternativa utilizada habitualmente, es incluir una o varias capas de adsorbentes (**co-columna**), en la parte inferior del cartucho de MSPD, debajo de la muestra dispersada. Materiales como Florisil, sílice ácida, alúmina o carbono, han sido utilizados con esta finalidad.

2.2.6.3. Aplicaciones de MSPD

En los últimos años, se han incrementado de manera notable el número de aplicaciones de MSPD. El interés que ha despertado esta metodología, puede atribuirse en gran parte, a las ventajas asociadas a la técnica. Su versatilidad, y la posibilidad de realizar la extracción y limpieza en una sola etapa, son los principales atractivos del método, ya que conducen a una reducción del tiempo dedicado a la preparación de la muestra, y permiten reducir el consumo de disolventes.

La MSPD se ha aplicado a la extracción de una gran variedad de contaminantes de matrices alimentarias [602-604], biológicas [588,605,606] y medioambientales [600,601] (tabla II.15).

No existen demasiadas aplicaciones de esta técnica para la extracción de PAHs. Crouch y Barker [605] proponen un método para la determinación de benzo[a]pireno en músculo de pescado, basado en MSPD y HPLC con detección de fluorescencia y UV. 0.5 g de pescado se mezclan con 2 g de C_{18} . La mezcla se transfiere a una columna que contiene 2 g de Florisil y la elución se lleva a cabo con acetonitrilo, consiguiendo recuperaciones entre 74-112%. Loveland y col. [607] desarrollaron un método para aislar y determinar dibenzo[a,l]pireno en piensos de la trucha arco iris. La muestra se dispersa con C_{18} y la elución se lleva a cabo con hexano-benceno (4:1, v/v). Las recuperaciones de dibenzo[a,l]pireno oscilaron entre 101-107% con coeficientes de variación entre 1-7%. Por otra parte, Alberio y col. [608] publicaron un método multiresiduo, para la determinación de PAHs en miel. El tratamiento de la muestra está basado en MSPD con algunas modificaciones. 1.5 g de miel se colocan en un tubo de vidrio y se mezclan con 1.5 mL de metanol, utilizando un vortex para la completa disolución de la muestra. 2 mL de la disolución se transfieren a una columna que contiene 2.5 g de Florisil y 1 g de sulfato sódico anhidro. La muestra de miel, se dispersa a través de la columna, con ayuda del metanol. La extracción de los analitos se lleva a cabo utilizando 5 mL de hexano-acetato de etilo (9:1, v/v), mediante un proceso asistido por ultrasonidos (2x15min). Los PAHs se determinaron mediante GC-MS, consiguiendo recuperaciones entre 80-101% y LODs entre 0.04-3 ng g⁻¹. Pensado y col. [609] han descrito un método para la preparación de muestras de pescado. Se evaluaron diferentes soportes sólidos, así como la influencia del contenido graso de la muestra, en la eficiencia de la extracción. Bajo condiciones óptimas, la muestra se dispersa con C_{18} y sulfato sódico anhidro. Florisil y C_{18} son utilizados como

cocolumna, mientras que la elución se lleva a cabo con acetonitrilo. Las recuperaciones obtenidas superan el 80% para todos los compuestos estudiados.

Más recientemente, Sánchez-Brunete y col. [178] proponen un método de MSPD asistido por ultrasonidos, para la preparación de muestras de lodo. La muestra se dispersa con alúmina y la mezcla resultante se transfiere a una columna que contiene sulfato sódico anhidro. Los analitos se extraen con diclorometano, mediante un proceso asistido por ultrasonidos (10 min). El extracto resultante se somete a una etapa de limpieza adicional, utilizando 2 g de C_{18} , y 10 mL de acetonitrilo para la elución. Trabajando en estas condiciones se obtienen recuperaciones en el rango de 85-108%. Otras aplicaciones recientes, utilizan MSPD para la extracción de PAHs de bivalvos [610], bitumen [611] y renacuajos [612].

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Tabla II. 15 Condiciones utilizadas en algunas aplicaciones de MSPD.

Analitos	Matriz	Dispersante	Co-columna	Disolvente	R (%)	Ref
Alquilfenoles etoxilados	Pescado (0.5 g)	2 g C ₁₈	3 g Alu	15 mL MeOH	97-100	[613]
Aminas bioactivas	Tomate (1 g)	5 g Arena		15 mL HClO ₄ (0.6 M)	95-102	[592]
Bactericidas fenólicos	Polvo interior (0.5 g)	1.5 g C ₁₈	2 g Flo	10 mL AcN	80-114	[614]
Benzo[a]pireno	Pescado (0.5 g)	2 g C ₁₈	2g Flo	8 mL AcN	74-112	[605]
Carbamatos	Fruta (0.5 g)	0.5 g C ₈		10 mL DCM-AcN (6:4)	64-106	[615]
Clenbuterol	Hígado bovino (0.5 g)	2 g C ₁₈		20 mL AcN (1% Acet)	96	[616]
Dibenzo[a,l]pireno	Pienso (0.5 g)	2 g C ₁₈	2 g Flo	30 mL Hex-Benz (4:1)	101-107	[607]
Ésteres organofosforados	Polvo interior (0.5 g)	0.5 g Flo	0.5 g Alu	2.5 mL Ace	80-116	[593]
Fenoles, bisfenoles	Lodo y sedimento (0.2 g)	2 g Flo	1-2 g Flo	2.5 mL AcN	81-105	[595]
Fentoato	Suelo (4 g)	6 g Flo		30 mL Hex-Ace Et (7:1)	79-94	[617]
Fungicidas	Frutas y vegetales (0.5 g)	0.5 g C ₁₈		10 mL Ace Et	71-102	[618]
Herbicidas	Patatas (0.5 g)	0.5 g C ₈		3 mL fostato+10 mL MeOH	68-98	[619]
Isoflavonoides	Plantas (0.25 g)	0.5 g Oasis HLB		1 mL H ₂ O-MeOH (0.02 mL NH ₄ OH (25%)) (95:5)	---	[620]
Isómeros hexaclorociclohexano	Plantas (5 g)	0.5 g Flo/1 g MgSO ₄ /0.5 g NaCl	2 g Alu/0.5 g Na ₂ SO ₄ anh	20 mL Hex-Acet Et (70:30)	91-98	[621]
Ocratoxina A	Cereales (2.5 g)	1.5 g C ₈		20 mL MeOH-Fórm (99:1)	78-89	[622]
PAHs	Miel (1.5 g)	1.5 mL MeOH	2.5 g Flo/1 g Na ₂ SO ₄ anh	5 mL Hex-Ace Et (9:1)	80-101	[608]
PAHs	Músculo de pescado (0.2 g)	2 g C ₁₈ /0.5 g Na ₂ SO ₄ anh.	2 g Flo/1 g C ₁₈	10 mL AcN	80-105	[609]
PAHs	Lodo (2 g)	3 g Alu		12 mL DCM	85-108	[178]
PAHs	Bivalvos (0.1 g)	0.4 g C ₁₈	0.1 g Flo	1.2 mL AcN	52-100	[610]
PAHs	Bitumen (2 mL)	15 g Sil	5 g Alu/0.5 g Cu	80 mL Hex-Ace Et (4:1)	57-94	[611]
PAHs	Renacuajos (2 g)	10 g Sil/35 g Na ₂ SO ₄ anh	30 g Na ₂ SO ₄ anh	300 mL AcN	50-108	[612]
PCBs, PBDEs, PBBs	Pienso acuicultura (1.5 g)	1 g C ₁₈	2 g Sil ac/1.5 g Alu	30 mL Hex	50-96	[623]
PCBs, PBDEs	Matrices biológicas (0.5 g)	2 g Na ₂ SO ₄ anh/1.5 g Flo	5 g Sil ác	20 mL Hex	74-99	[624]
PCBs, pesticidas	Alimentos grasos (0.5 g)	1.5 g Celita	5 g Flo	5 mL DMSO	61-98	[625]
PCBs, OCPs	Huevos (1 g)	2 g Flo		10 mL Hex-DCM (1:1)	82-110	[626]
Pesticidas	Suelo (10 g)	10 g Flo		50 mL DCM	72-105	[594]
Pesticidas	Fruta (0.5 g)	0.5 g C ₁₈		100 mL DCM-MeOH (1:1)	52-108	[627]
Pesticidas	Fruta (0.5 g)	0.5 g C ₈		15 mL DCM	74-84	[628]
Pesticidas	Soja (1 g)	2 g Sil	0.5 g C ₈	25 mL Acet Et-MeOH (4:1)	60-120	[590]
Pesticidas	Fruta (0.025 g)	0.025 C ₈		100 µL Acet Et	83-118	[629]
Pesticidas	Té (0.5 g)	2 g Flo		15 mL Hex-DCM (1:1)	80-97	[597]
OCPs	Tabaco (5 g)	5 g Flo	5 g Flo	60 mL Hex	77-99	[630]
Sulfonamidas	Pollo (0.5 g)	2 g Alu		10 mL H ₂ O-EtOH (3:7)	85-117	[598]

Alu, alúmina; HClO₄, ácido perclórico; Flo, Florisil; AcN, acetónitrilo; DCM-AcN, diclorometano-acetonitrilo; AcN (1% Acet); acetónitrilo que contiene 1% de ácido acético; Hex-Benz, hexano-benceno; Ace, acetona; Hex-Ace Et, hexano-acetato de etilo; Ace Et, acetato de etilo; fostato; tampón fosfato 50 mM, pH 7.4; H₂O-MeOH (0.02 mL NH₄OH (25%)), agua-metanol (contiene 0.02 mL de hidróxido amónico al 25%); Mg₂SO₄, sulfato de magnesio; NaCl, cloruro sódico; Na₂SO₄ anh, sulfato sódico anhidro; MeOH-Fórm, metanol-ácido fórmico; DCM, diclorometano; Cu, polvo de cobre; Sil, sílice; PCBs, bifenilos policlorados; PBDEs, difeniléteres polibromados; PBBs, bifenilos polibromados; Hex, n-hexano; Sil ac, sílice ácida; DMSO, dimetilsulfóxido; OCPs, pesticidas organoclorados; Hex-DCM, hexano-diclorometano; DCM-MeOH, diclorometano-metanol; Ace Et-MeOH, acetato de etilo-metanol; H₂O-EtOH, agua-etanol; ---información no disponible en la publicación; mezclas de disolventes referidas a v/v.

2.3. MÉTODOS DE PURIFICACIÓN DE EXTRACTOS

Independientemente de la técnica de extracción utilizada, los extractos pueden contener interferencias (lípidos, pigmentos, resinas, u otros componentes de la matriz), que causan problemas en el análisis de los PAHs. En muchas ocasiones, estos extractos deben someterse a **etapas de purificación** adecuadas, que permitan eliminar las sustancias indeseadas, antes de la determinación de los analitos.

La elección de la técnica de purificación, está influenciada por la selectividad y sensibilidad que se desea alcanzar, así como por el método de determinación utilizado. El método de purificación más habitual es la SPE, pero existen otras posibilidades como el uso de inmunoadsorbentes, o la cromatografía de permeación sobre gel. Recientemente, también se encuentran aplicaciones en las que se utilizan técnicas de microextracción como etapa de limpieza.

La **SPE** es la técnica clásica de purificación y fraccionamiento de extractos. Utilizando esta técnica, se consigue discriminar los componentes de la matriz y los analitos de interés, en función de la selectividad del adsorbente utilizado. Los métodos oficiales EPA 3630C, EPA 3610B y EPA 3620C, proponen respectivamente el uso de sílice, alúmina y Florisil, para la purificación de extractos orgánicos de muestras sólidas medioambientales [631-633].

Uno de los mayores problemas asociados con el análisis de matrices biológicas, es que la mayoría de ellas presentan un elevado contenido graso, lo que conduce a grandes cantidades de lípidos coextraídos, sobre todo si se lleva a cabo la extracción de compuestos apolares, como es el caso de los PAHs. La digestión ácida o la saponificación, son métodos destructivos, utilizados habitualmente para la eliminación de lípidos. La SPE es otra alternativa de uso frecuente. Sílice, Florisil y alúmina son los adsorbentes más comunes en este tipo de aplicaciones [461,552].

El lodo de depuradora de aguas residuales, está considerada como una de las matrices más complejas que existe, ya que contiene grandes cantidades de contaminantes de diferente naturaleza, lípidos y otro tipo de sustancias, que complican su análisis. La SPE también se ha utilizado como técnica de purificación de extractos de lodo. Oleszczuk y Baran [634] han estudiado diferentes tipos de

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

adsorbentes (C_8 , C_{18} , C_{18} PolarPlus, sílice, fenilsilano y cianopropilsilano) para la purificación de extractos de lodo, en la determinación de PAHs, y encontraron el C_{18} como una de las mejores alternativas. La SPE también es el método más habitual para la limpieza de extractos de suelos y sedimentos [635]. Se han utilizado un gran número de adsorbentes (alúmina, Florisil, resinas de intercambio iónico, gel de sílice, C_8 , C_{18} , fenilsilano, cianopropilsilano, etc.) para aislar contaminantes orgánicos de este tipo de extractos.

Aplicaciones más concretas, han utilizado **inmunoadsorbentes**. Estos se basan en interacciones antígeno-anticuerpo selectivas y reversibles, que pueden retener contaminantes relacionados estructuralmente. Por ejemplo, Pérez y col. [636] han conseguido aislar selectivamente los PAHs de matrices medioambientales complejas (lodos y sedimentos), mediante una metodología basada en las interacciones antígeno-anticuerpo. Las muestras se extraen previamente, mediante USE con una mezcla de diclorometano-metanol (2:1, v/v), y los extractos resultantes se llevan a un volumen final de 100 mL de agua, para realizar la extracción con los inmunoadsorbentes anti-fluoreno. Los resultados obtenidos, se compararon con aquellos obtenidos mediante procedimientos de limpieza convencionales, y se observó que con este método se conseguía una mejor selectividad para los PAHs, permitiendo su determinación a niveles de ppb.

La **cromatografía de permeación sobre gel** (gel permeation chromatography, GPC), es otra de las alternativas. Aunque el número de aplicaciones es más limitado, esta técnica resulta especialmente útil, cuando se trata de remover material lipídico procedente de muestras biológicas. La EPA en su método 3640A [637], recomienda la GPC para la eliminación de lípidos, polímeros, proteínas, resinas naturales, componentes celulares, esteroides y compuestos de elevado peso molecular. Además considera esta técnica apropiada para analitos polares y no-polares, por lo que puede ser utilizada de manera efectiva para la limpieza de extractos que contengan un gran rango de analitos. Entre otras aplicaciones, la GPC ha sido empleada para la limpieza de extractos de pescado [562], lodo [182] y vegetación [638], en la determinación de PAHs.

En la actualidad, muchas de las metodologías optan por acoplar **técnicas de microextracción**, como métodos de purificación de extractos. En una primera etapa, se lleva a cabo la extracción de los analitos de las matrices sólidas, utilizando técnicas como PLE, USE, Soxhlet, etc., y en segundo lugar, los analitos

de interés se aislan del extracto mediante técnicas de microextracción. Por ejemplo, Ratola y col. [639] han desarrollado un método de HF-LPME, como un procedimiento de limpieza rápido y simple, utilizado en la determinación de PAHs en muestras vegetales complejas. HF-LPME permite eliminar las interferencias presentes en los extractos, dando lugar a cromatogramas (GC-MS) muy limpios, y evitando el deterioro de la columna cromatográfica.

2.4. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN

La determinación de los PAHs se realiza habitualmente mediante **HPLC** o **GC**, acopladas a diferentes sistemas de detección. En este capítulo se describen aspectos prácticos de estas técnicas, enfocados al análisis de estos contaminantes. No se incluye una explicación pormenorizada de la teoría y fundamentos básicos de las técnicas cromatográficas, dado que existen numerosas publicaciones dedicadas a este fin [640-646].

2.4.1. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

HPLC es la técnica de separación más ampliamente utilizada en la determinación de PAHs. Su éxito se debe a la posibilidad de actuar de forma muy precisa sobre la selectividad entre los compuestos a través de la elección de la columna y de la composición del eluyente, es decir, el sacar partido de las interacciones disolución/fase móvil/fase estacionaria. Además, la técnica de HPLC puede utilizarse para la determinación de un gran número de PAHs, incluso de elevado peso molecular, puesto que al contrario de lo que ocurre en GC, la volatilidad de los analitos no resulta un problema.

La detección UV y de fluorescencia son las más populares para la determinación de los PAHs tras su separación mediante HPLC. La detección de fluorescencia presenta dos ventajas obvias sobre la detección UV, la gran selectividad y mayor sensibilidad. Ambos aspectos son cruciales puesto que las muestras medioambientales pueden contener bajos niveles de PAHs y gran cantidad de compuestos que pueden interferir en el análisis.

2.4.1.1. Separación de PAHs mediante HPLC

La cromatografía en fase inversa, utilizando C_{18} como fase estacionaria, es el método más habitual para llevar a cabo la separación y determinación de los PAHs (tabla II.17) [647]. El principal requisito es que los compuestos se solubilicen en los disolventes utilizados como fase móvil. Kayillo y col. [648] estudiaron la retención y la selectividad de un grupo de PAHs en cinco tipos de columnas en fase inversa (C_{18} , C_{18} aqua, propil-fenil, Synergi polar-RP y Cosmosil 5PBB) (figura II.18). Los resultados revelaron que las columnas tipo fenil producen mejor separación de los PAHs lineales, mientras que la separación de isómeros estructurales de PAHs mejora con las columnas de C_{18} .

Tabla II. 17 Fases estacionarias y móviles utilizadas en la determinación de PAHs.

Columna	Fase móvil	Matriz	Ref
Vydac 201TP52 (C_{18} , 250 x 2.1 mm, 5 μ m)	AcN-H ₂ O	Agua de bebida	[300]
Isis Nucleodur EC (C_{18} , 125 x 2.1 mm, 3 μ m)	MeOH-H ₂ O (1 mM NH ₄ Ac)	Agua superficial	[315]
Supelcosil LC-PAH (C_{18} , 250 x 3 mm, 5 μ m)	AcN-H ₂ O	Carne ahumada	[520]
Vydac 201TP52 (C_{18} , 250 x 2.1 mm, 5 μ m)	MeOH (0.5% Acet)-H ₂ O (0.5% Acet)	Sedimento marino	[541]
LichroCART 250-3 Lichrospher PAH (250 x 3 mm, 3 μ m)	AcN-H ₂ O	Lodo	[177]
Nova-Pack RP- C_{18} LC (150 x 3.99 mm, 4 μ m)	AcN-H ₂ O	Suelo	[544]
B[a]P-VP-DVB (150 x 4.6 mm, 25-63 μ m)	AcN-DCM	Café	[649]
B[a]P-VP-DVB (150 x 4.6 mm, 25-63 μ m)	AcN-DCM	Agua de grifo y lago	[649]

AcN, acetonitrilo; H₂O, agua ultrapura; NH₄Ac, acetato amónico; MeOH (0.5% Ace), metanol que contiene 0.5% de ácido acético; H₂O (0.5% Ace), agua ultrapura que contiene 0.5% de ácido acético; B[a]P-VP-DVB, benzo[a]pireno impreso en poly-(4-vinilpiridina-co-divinilbenceno); DCM, diclorometano.

En los últimos años, se han desarrollado nuevas **fases estacionarias**, que han sido aplicadas a la separación de los PAHs. Algunos ejemplos son fases formadas por polímeros impresos molecularmente como benzo[a]pireno impreso en poly-(4-vinilpiridina-co-divinilbenceno) [649] o pireno impreso en poly-(4-vinilpiridina-co-divinilbenceno) [650]; o fases de sílice modificada con fases enlazadas (calixarenos [651], tiocarbamatos [652], poli(4-vinilpiridina) [653], o grupos arilo (fenilbutil, fenilpropil, natilpropil) [654]).

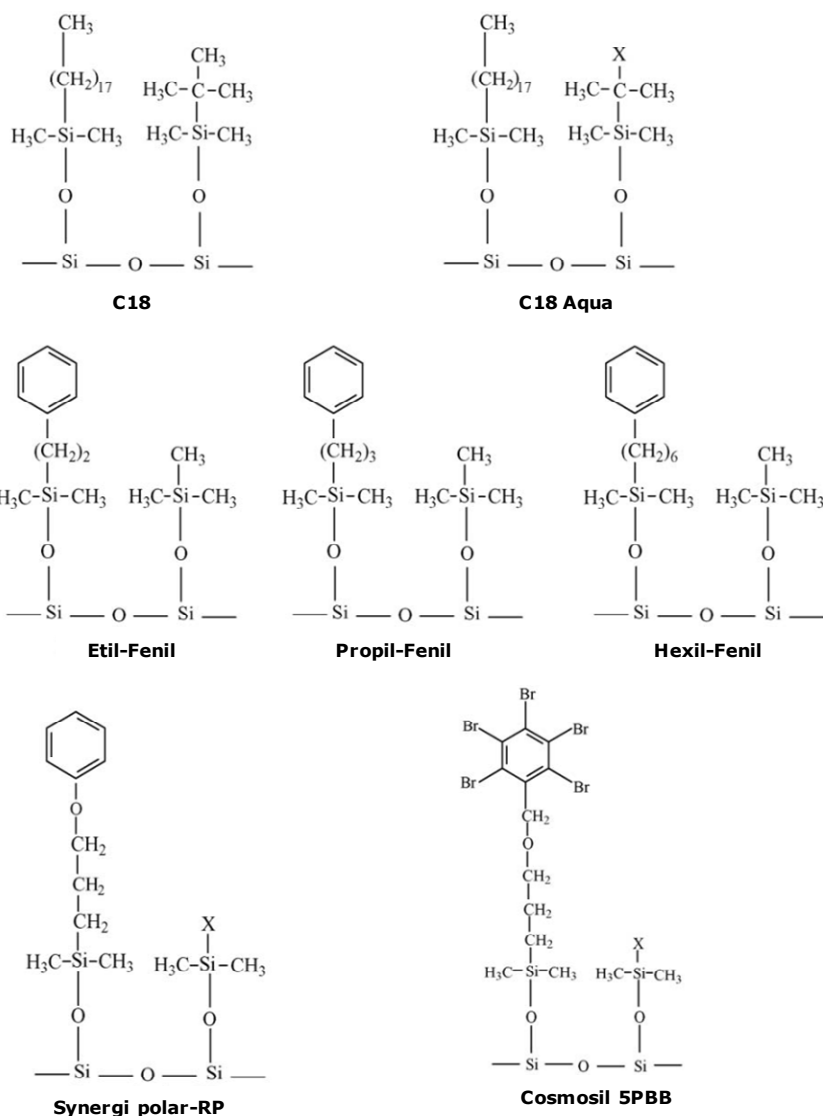


Figura II.18 Estructuras de algunas fases estacionarias utilizadas en HPLC [648].

2.4.1.2. Sistemas de detección

Los sistemas de detección más habituales para llevar a cabo la determinación de los PAHs son, sin duda, fluorescencia y UV. Se trata de detectores no destructivos, por lo que existe la posibilidad de colocarlos en serie, y llevar a cabo la determinación mediante dos vías, en una única inyección.

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Los detectores de **fluorescencia** se caracterizan tanto por su elevada selectividad (pocas son las moléculas que exhiben fluorescencia, aunque el número aumenta por formación de derivados fluorescentes pre o post-columna) como por su gran sensibilidad, por lo que resultan muy útiles en el análisis de compuestos a niveles traza (tabla II.18). Por su parte los espectros **UV** ofrecen información muy útil a la hora de confirmar identidades. De hecho, la combinación de HPLC con estos detectores, ha sido utilizada en el análisis de PAHs de matrices de gran complejidad, como suelos [544], sedimentos [466], lodos [526] y material biológico [655]; así como en muestras de agua [300,656], donde los niveles de estos analitos suelen ser muy bajos.

Otra alternativa es la detección mediante **espectrometría de masas** (MS). El número de aplicaciones de esta técnica para la determinación de los PAHs, es muy reducido, si se compara con fluorescencia. Este hecho puede atribuirse principalmente a que se trata de compuestos no-iónicos y apolares, de difícil ionización y fragmentación. Sin embargo, HPLC-MS ofrece mayor exactitud en los resultados, debido a que se generan datos espectrales que aportan información adicional, permite la identificación de compuestos con picos cromatográficos no resueltos, y algunos equipos ofrecen la posibilidad de múltiples etapas de MS sobre la misma muestra, facilitando la elucidación de estructuras complejas. Algunos ejemplos son, el análisis de PAHs en CRMs (1649a, 1650, 2975, polvo urbano y materia particulada de motores diesel) [657], suelos [658] y sedimentos [659].

Tabla II. 18 Límites de cuantificación instrumentales ($\mu\text{g L}^{-1}$) para los PAHs, utilizando distintos sistemas de detección en HPLC.

PAHs	UV ^a	UV	Flu ^b	APPI/MS ^a
Naftaleno	1123	0.0047	10	---
Acenaftileno	3037	0.013	---	---
Acenafteno	3500	0.015	8	---
Fluoreno	377	0.0011	8.5	---
Fenantreno	113	0.0005	9.5	5
Antraceno	83	0.00032	7.5	4.3
Fluoranteno	67	0.0012	9	4
Pireno	80	0.0019	20.5	4.3
Benzo[a]antraceno	167	0.0019	11.5	1.3
Criseno	120	---	8	1.34
Benzo[b]fluoranteno	223	---	7	15.3
Benzo[k]fluoranteno	147	0.0029	9	5.3
Benzo[a]pireno	167	0.0037	7.5	3.3
Dibenzo[a,h]antraceno	343	0.0072	8	---
Benzo[g,h,i]perileno	223	0.0098	17	4.3
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	133	0.01	11	2.5
Vol iny (μL)	10	200	20	10
Ref.	[660]	[661]	[526]	[659]

^a calculados a partir de LODs; ^b calculados a partir de los LOQs analíticos; APPI/MS, fotoionización a presión atmosférica (atmospheric pressure photoionization) acoplada a espectrometría de masas.

2.4.2. CROMATOGRAFÍA DE GASES

GC es una técnica utilizada frecuentemente para la separación de los PAHs, debido principalmente al elevado poder de resolución que ofrece esta técnica. La detección se lleva a cabo habitualmente mediante un detector de ionización de llama o mediante espectrometría de masas, siendo este último el más utilizado, debido a la gran sensibilidad asociada a la técnica. La fragmentación de los PAHs con las fuentes de ionización comunes suele ser baja. En consecuencia, el pico correspondiente al ión molecular presenta generalmente gran intensidad.

La retención y separación de los PAHs está afectada por el tipo y la cantidad de disolvente, las condiciones de inyección (velocidad, tamaño de liner, tamaño de muestra y temperatura) y el programa de temperatura [662,663,664]. Las columnas capilares se utilizan normalmente con un gap (pieza de tubo capilar de vidrio desactivado y vacío (aprox. 0.25 mm x 5 m) cuya misión consiste en remover los compuestos no-volátiles, minimizar la contaminación de la columna, y reconcentrar los analitos, mejorando la forma de pico [665]. La inyección fría en columna es preferible para el análisis de los PAHs, ya que mejora la resolución de

los PAHs de bajo peso molecular (compuestos que eluyen más temprano) y reduce la discriminación de los PAHs de alto peso molecular. Estos aspectos son más difíciles de controlar cuando se utiliza inyección en splitless [666].

2.4.2.1. Separación de PAHs mediante GC

El aspecto más crítico en el desarrollo de un método de GC, es la selección de una fase estacionaria apropiada [667-670]. Las **fases estacionarias** más comunes para la separación de estos compuestos, son metil y fenil polisiloxanos. Este tipo de fases producen señales de fondo relativamente bajas (sangrado de columna), incluso a elevadas temperaturas ($>300^{\circ}\text{C}$) y con detectores no selectivos, como el FID. Además, comercialmente se dispone de una gran variedad de fases metilpolisiloxano, que contienen 0%, 5%, 50% e incluso 65% de sustituyente fenil.

Otras alternativas son la DB-XLB, o columnas con fase estacionaria líquido-cristalina (LC-50), que han sido desarrolladas con el fin de mejorar la selectividad para estos compuestos. Por ejemplo, las columnas con fase líquido-cristalina, son adecuadas para la separación de isómeros de PAHs que típicamente coeluyen en las columnas tradicionales 5% fenil metilpolisiloxano (criseno y trifenileno; benzo[b]fluoranteno y benzo[j]fluoranteno; y dibenzo[a,c]antraceno y dibenzo[a,h]antraceno) [671,672]. Este tipo de columnas también permite la separación de PAHs metil-sustituídos [671]. No obstante, presentan algunas limitaciones, ya que se observan cambios en el orden de elución de los analitos, en función de la columna comercial utilizada, y permiten trabajar en un rango de temperaturas limitado, que a su vez limita el rango de masas en la determinación de los PAHs [673]. Para solucionar algunos de estos inconvenientes, se ha desarrollado una columna de 50% dimetil-50% de fase polisiloxano-líquido cristalina, que ofrece un mayor rango de temperaturas, y permite la determinación de los PAHs de mayor peso molecular [674]. De todos modos, aunque este tipo de fases permiten la separación de estos pares de compuestos, otros como el benzo[a]fluoranteno y benzo[j]fluoranteno coeluyen [672].

Hasta el momento, no se dispone de una columna cromatográfica, que permita la separación de todos los PAHs que se encuentran en el medio ambiente. Generalmente, para la cuantificación de estos analitos se recomienda el uso de múltiples columnas. Esta alternativa conlleva un incremento del coste y del tiempo

de análisis, por lo que la selectividad de las fases estacionarias sigue siendo un aspecto muy estudiado.

2.4.2.2. Inyección de grandes volúmenes

La creciente demanda por obtener límites de detección cada vez más bajos, que permitan la determinación de analitos a niveles traza, ha conducido al desarrollo de nuevas alternativas, como la introducción de mayores volúmenes de muestra en los sistemas cromatográficos [675].

La inyección de grandes volúmenes (large volume injection, LVI), no sólo mejora la sensibilidad, sino que ofrece la posibilidad de reducir o eliminar la etapa de concentración de la muestra (p. ej. evaporación del disolvente), acortando el tiempo total del análisis, y mejorando la exactitud, ya que se minimizan las pérdidas de los analitos en la etapa de concentración. Si el extracto de muestra es lo suficientemente limpio y/o la selectividad del detector es elevada, los límites de detección mejoran en función del volumen inyectado.

La inyección de elevados volúmenes de muestra (20-100 μL) en el sistema, puede realizarse mediante inyección on-column e inyección a temperatura programada, siendo esta última la más utilizada. El inyector de temperatura programada ofrece la posibilidad de programar la temperatura de la cámara de volatilización durante la inyección (programmed-temperature vaporizing (PTV) injection). La inyección se realiza a una temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente y con la válvula de purga abierta. En estas condiciones el gas portador se satura con el vapor procedente del disolvente que se elimina en su mayor parte a través de la válvula de purga, mientras que los analitos menos volátiles permanecen retenidos. A continuación, se cierra la válvula de purga y se desorben térmicamente los analitos y los restos de disolvente en la columna cromatográfica. Por último, se abre la válvula de purga, mientras se mantiene una temperatura elevada en el inyector, con objeto de eliminar los compuestos poco volátiles que permanecen en el material adsorbente [676,677].

Algunos ejemplos recientes, utilizan la inyección de grandes volúmenes de muestra, para la determinación de PAHs en aguas [424], muestras biológicas [529], sedimentos [678] y partículas atmosféricas [574].

2.4.2.3. Sistemas de detección

Uno de los detectores más utilizados es la **espectrometría de masas** de impacto electrónico (EI) con cuadrupolo. A pesar de la pobre fragmentación que sufren los PAHs, utilizando este sistema de detección, se producen señales intensas de los iones moleculares [666]. La monitorización del ión selectivo (SIM) en GC-EI/MS, presenta ciertas ventajas sobre el modo full-scan, como por ejemplo, los bajos límites de detección que se consiguen. En general, se trata de un sistema fácil de utilizar y de un coste razonable, lo que ha originado que GC-EI/MS se convirtiese en una de las técnicas habituales para la determinación de estos contaminantes.

La ionización química negativa y positiva (PCI y NCI, respectivamente) son modos de ionización alternativos a EI/MS. Los métodos convencionales de ionización química, utilizan metano como gas reactivo, obteniendo espectros de masa similares a aquellos producidos mediante GC-EI/MS. Otros gases reactivos son dimetil éter, tetrametilsilano, amonio, dióxido de carbono o mezclas de gases [679]. Riahi y col. [680] estudiaron la separación de 5 grupos de isómeros de PAHs mediante GC-PCI/MS, utilizando amonio y dimetil éter como gases reactivos. Los resultados demostraron que el dimetil éter es más selectivo para este grupo de compuestos. Yurchenko y Mölder [681] han utilizado GC-PCI/MS para el análisis de PAHs en pescado fresco y ahumado, aceite de oliva y aceite de colza, empleando amonio como gas reactivo. Los límites de detección y las recuperaciones oscilaron entre 0.24-0.27 ppb y 75-87%, respectivamente, para los seis PAHs estudiados. GC-NCI/MS fue el método utilizado para la determinación de PAHs, nitroPAHs y oxiPAHs en muestras de suelo urbano y partículas atmosféricas [682]. Aunque NCI generalmente produce menor sensibilidad, se ha demostrado que si se utiliza metano como gas reactivo, se consigue un método sensible y selectivo con los PAHs isoméricos [666].

Otra alternativa es MS con trampa de iones (IT/MS). Esta técnica se ha utilizado para la determinación de PAHs en agua de mar, mejillones [298], sedimentos [683] y lodo [182]. Los analizadores de IT son rápidos, ya que un barrido completo del rango habitual de trabajo (10-650 m/z) se obtiene en 1 s o menos. No obstante presentan ciertas limitaciones, dado que las trampas de iones almacenan todos los iones producidos en la fragmentación de la muestra y los van

filtrando progresivamente, no es posible la selección de iones discontinuos como en el modo SIM. A pesar de este inconveniente desde el punto de vista de su aplicación en análisis de ultratrazas, las trampas de iones presentan la ventaja frente a los cuadrupolos, de ser muy fácilmente configurables para el trabajo con MS/MS e incluso MSⁿ. Dentro de esta modalidad, la disociación mediante colisión inducida (CID), ha mostrado elevada sensibilidad para el análisis de PAHs en aceite de motor usado [684].

GC-FID es un método que todavía se sigue utilizando en la actualidad. Una ventaja asociada a este sistema de detección, es que la respuesta es proporcional al número de carbonos, por lo que se pueden cuantificar compuestos dentro del mismo grupo de isómeros, incluso si no se dispone de patrones de calibración de todos ellos. En la literatura, se encuentran numerosas aplicaciones de GC-FID para la determinación de PAHs en muestras medioambientales. Algunos ejemplos son el análisis de estos contaminantes, en partículas aéreas [685], agua [686] y sedimentos [687]. No obstante, si se trata de muestras de elevada complejidad, lo más común es utilizar GC-MS para la determinación, puesto que permite obtener mayor exactitud que los métodos de detección universales. Además de conseguir mayor sensibilidad (tabla II.19), la selectividad asociada a la naturaleza del detector (MS) permite minimizar las interferencias de otras sustancias procedentes de la matriz.

Tabla II. 19 Límites de cuantificación instrumentales ($\mu\text{g L}^{-1}$) para los PAHs, utilizando distintos sistemas en cromatografía de gases.

PAHs	GC-FID	GC-EI-MS	GC-EI-MS/MS	LVI-GC-EI-MS	LVI-GC-EI-MS/MS
Naftaleno	---	0.43	4.76	0.20	0.013
Acenaftileno	---	0.71	2.03	0.61	0.029
Acenafteno	---	0.83	1.33	0.66	0.0075
Fluoreno	3330	0.78	1.25	0.11	0.0072
Fenantreno	4640	0.46	0.93	0.11	0.0057
Antraceno	3530	0.65	1.04	0.15	0.0071
Fluoranteno	4240	0.67	0.57	0.12	0.0046
Pireno	3790	0.73	0.70	0.12	0.0050
Benzo[a]antraceno	3730	2.50	0.23	0.35	0.0034
Criseno	3000	3.33	0.34	0.25	0.0029
Benzo[b]fluoranteno	3520	3.03	1.27	0.68	0.0098
Benzo[k]fluoranteno	5680	4.76	1.72	0.71	0.0097
Benzo[a]pireno	6200	10	3.57	0.73	0.017
Dibenzo[a,h]antraceno	3440	14.29	0.40	2.24	0.040
Benzo[g,h,i]perileno	8000	11.11	3.57	1.54	0.045
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	8250	7.69	2.56	0.56	0.033
Vol iny (μL)	1	1	1	25	25
Ref.	[688]	[469]	[182]	[529]	[529]

2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

En los últimos años, **TOF/MS** combinado con GC o LC ha despertado gran interés en el análisis medioambiental [689-691]. Uno de los aspectos más importantes de este método de detección, es que se puede adquirir la masa exacta, la información de full-scan y los datos cuantitativos en periodos de tiempo cortos. Además, debido a su elevado poder de resolución de masas, TOF/MS permite mejorar la relación señal/ruído, respecto al uso de un cuadrupolo simple. Este método de determinación ha sido aplicado en el análisis de PAHs en sedimentos, té [692] aceite vegetal [693] y cenizas [694].

GC acoplado a **MS con radioisótopo** (isotope-ratio mass spectrometry, IRMS) es otra de las alternativas utilizada para la determinación de PAHs. Hace aproximadamente una década, se demostró que las fuentes de emisión de PAHs al medio ambiente, podían determinarse mediante medidas del isótopo de carbono de los PAHs individuales [695,696]. En esta técnica, GC está acoplada a un horno de combustión, de modo que la composición isotópica del CO₂ resultante, es continuamente analizada, utilizando un analizador MS de sector magnético. La relación entre el compuesto específico y el isótopo de carbono (¹³C/¹²C), sirve para determinar cuantitativamente las fuentes de emisión de estos contaminantes, y se ha aplicado a estudios de contaminación del ambientes marinos, lacustres y terrestres [697-699].

BIBLIOGRAFÍA

- [1] R. G. Harvey, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Wiley-VCH, New York (1997).
- [2] P. Henner, M. Shavon, J. L. Morel, È. Lichtfouse, *Analisis Mag.* 25 (1997) 56.
- [3] D. W. Connell, Basic Concepts of Environmental Chemistry, Taylor & Francis Group, Boca Ratón, New York (2005).
- [4] C. Baird, Química Ambiental, 2ª ed., Reverté S. A., Barcelona (2001).
- [5] A. K. Haritash, C. P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.* 169 (2009) 1.
- [6] C. Orozco, A. Pérez, M. N. González, F. J. Rodríguez, J. M. Alfayete. Contaminación Ambiental: Una Visión desde la Química, Thomson, Madrid (2002).
- [7] World Health Organization (WHO), Environmental Health Criteria 202: Selected non-heterocyclic aromatic hydrocarbons. International Programme on Chemical Safety, Geneva (1998). <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>
- [8] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Toxicological profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta (1995). <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp69.pdf>
- [9] J. B. Gustafson, J. Griffith Tell, D. Orem, Selection of Representative TPH Fractions based on Fate and Transport Considerations, Total Petroleum Hydrocarbons Criteria Working Group Series, vol 3, Amherst Scientific Publishers, Massachussets (1997).
- [10] F. A. de Lima Ribeiro, M. M. C. Ferreira, *J. Mol. Struct. (Theochem)* 663 (2003) 109.
- [11] K. Ravindra, R. Sokhi, R. V. Grieken, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 2895.
- [12] A. Bjørseth, T. Ramdahl, Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Vol 2, Emission sources and recent progress in Analytical Chemistry, Marcel Dekker, Inc., New York (1985).
- [13] J. M. Neff, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment: Sources, Fates and Biological Effects, Applied Science Publishers LTD, London (1979).

BIBLIOGRAFÍA

- [14] Environmental Protection Agency, Guidance for Assessing Chemical Contaminant, Data for Use in Fish Advisories, vol 1, Fish Sampling and Analysis, 3^a ed., Washington (2000). <http://www.epa.gov/waterscience/fish/advice/volume1/>
- [15] T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A. D. Campiglia, *Talanta* 47 (1998) 943.
- [16] R. Dabestani, I. N. Ivanov, *Photochem. Photobiol.* 70 (1999) 10.
- [17] S. G. Wakeham, C. Schaffner, W. Giger, *Geochem. Cosmochim. Acta* 44 (1980) 415.
- [18] A. H. Neilson, *Organic Chemicals: An Environmental Perspective*, Lewis Publishers, Boca Ratón, New York (2000).
- [19] R. E. Laflamme, R. A. Hites, *Geochim. Cosmochim. Acta* 42 (1978) 289.
- [20] W. Wilcke, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 163 (2000) 229.
- [21] P. Baumard, H. Budzinski, P. Garrigues, H. Dizer, P. D. Hansen, *Mar. Environ. Res.* 47 (1999) 17.
- [22] J. O. Grimalt, B. L. van Drooge, A. Ribes, P. Fernández, P. Appleby, *Environ. Pollut.* 131 (2004) 13.
- [23] S. Messenger, S. Amari, X. Gao, R. M. Walker, S. J. Clemett, X. D. F. Chillier, R. N. Zare, R. S. Lewis, *Astrophys. J.* 502 (1998) 284.
- [24] L. W. Beegle, T. J. Wdowiak, J. G. Harrison, *Spectrochim. Acta Part A* 57 (2001) 737.
- [25] O. Botta, J. L. Bada, *Surv. Geophys.* 23 (2002) 411.
- [26] M. R. Wing, J. L. Bada, *Orig. Life Evol. Biosph.* 21 (1991) 375.
- [27] European Commission, Ambient Air Pollution by PAHs. Position paper, Office for Official Publications of the Europe Communities, Luxemburg, (2001). http://www.ec.europa.eu/environment/air/pdf/pp_pah.pdf
- [28] K. R. Smith, *Biofuels, Air Pollution and Health: A Global Review*, Plenum Press, New York (1987).
- [29] B. Maliszewska-Kordybach, *Pol. J. Environ. Stud.* 8 (1999) 131.
- [30] K. Srogi, *Environ. Chem. Lett.* 5 (2007) 169.
- [31] K. L. Bignal, S. Langridge, J. L. Zhou, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 8863.

-
- [32] P. Gustafson, C. Östman, G. Sällsten, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5074.
- [33] F. Esen, Y. Tasdemir, N. Vardar, *Atmos. Res.* 88 (2008) 243.
- [34] N. Vardar, F. Esen, Y. Tasdemir, *Environ. Pollut.* 155 (2008) 298.
- [35] J. Lv, R. Xu, G. Wu, Q. Zhang, Y. Li, P. Wang, C. Liao, J. Liu, G. Jiang, F. Wei, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 1368.
- [36] Y. Liu, L. Zhu, X. Shen, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 840.
- [37] R. Sakai, H. C. Siegmann, H. Sato, A. S. Voorhees, *Environ. Res. Sec. A* 89 (2002) 66.
- [38] N. E. Kepleis, W. R. Ott, J. L. Repace, *J. Expo. Anal. Env. Epid.* 9 (1999) 622.
- [39] L. Zhang, Z. Bai, Y. You, J. Wu, Y. Feng, T. Zhu, *Chemosphere* 75 (2009) 453.
- [40] J. C. Chuang, M. R. Kuhlman, N. K. Wilson, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 661.
- [41] H. Lu, L. Zhu, *J. Hazard. Mat.* 139 (2007) 193.
- [42] M. R. Mannino, S. Orecchio, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 1801.
- [43] M. Koyano, S. Mineki, Y. Tsunoda, O. Endo, S. Goto, T. Ishii, *J. Health. Sci.* 47 (2001) 452.
- [44] S. W. See, S. Karthikeyan, R. Balasubramanian, *J. Environ. Monit.* 8 (2006) 369.
- [45] L. Zhu, J. Wang, *Chemosphere* 50 (2003) 611.
- [46] B. K. Larsson, G. P. Sahlberg, A. T. Eriksson, L. A. Busk, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 867.
- [47] N. T. K. Oanh, D. O. Albina, L. Ping, X. Wang, *Biomass Bioenergy* 28 (2005) 579.
- [48] G. G. Pandit, P. K. Srivastava, A. M. Mohan Rao, *Sci. Total Environ.* 279 (2001) 159.
- [49] World Health Organization, *World Health Report 2002: Reducing Risks, promoting healthy life*, Geneva (2002). <http://www.who.int/whr/2002/en/>
- [50] C. Venkatarman, G. Negi, S. B. Sardar, R. Rastogi, *J. Aerosol Sci.* 33 (2002) 503.

- [51] A. Bhargava, R. N. Khanna, S. K. Bhargava, S. Kumar, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 4761.
- [52] B. H. Chen, Y. S. Lin, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 1394.
- [53] G. Perelló, R. Martí-Cid, V. Castell, J. M. Llobet, J. L. Domingo, *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 709.
- [54] P. F. Nelson, A. R. Tibbett, S. J. Day, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 5291.
- [55] M. C. H. Lim, G. A. Ayoko, L. Morawska, Z. D. Ristovski, E. R. Jayaratne, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 150.
- [56] E. Morillo, A. S. Romero, L. Madrid, J. Villaverde, C. Maqueda, *Water Air Soil Pollut.* 187 (2008) 41.
- [57] A. H. Miguel, T. W. Kirchstetter, R. A. Harley, S. V. Hering, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 450.
- [58] J. C. Dunbar, C.-I. Lin, I. Vergucht, I. Wong, J. L. Durant, *Sci. Total Environ.* 279 (2001) 1.
- [59] J. Beyea, S. D. Stellman, M. Hatch, M. D. Gammon, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 7315.
- [60] F. Napier, B. D'Arcy, C. Jefferies, *Desalination* 226 (2008) 143.
- [61] M. Tavares, J. P. Pinto, A. L. Souza, I. S. Scarmínio, M. C. Solci, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 5039.
- [62] J. Kholer, T. Kunniger, *Eur. J. Wood Wood Prod.*, 61 (2003) 117.
- [63] Y.-C. Chen, W.-J. Lee, S.-N. Uang, S.-H. Lee, P.-J. Tsai, *Atmos. Environ.* 40 (2006) 7589.
- [64] V. Barcan, E. Kovnatsky, A. Shylina, *Atmos. Environ.* 34 (2000) 1225.
- [65] D. A. Cooper, *Atmos. Environ.* 35 (2001) 4189.
- [66] D. A. Cooper, *Atmos. Environ.* 37 (2003) 3817.
- [67] R. Alzaga, P. Montuori, L. Ortiz, J. M. Bayona, J. Albaigés, *J. Chromatogr. A* 1025 (2004) 133.
- [68] D. Pastor, J. Sánchez, C. Porte, J. Albaigés, *Mar. Pollut. Bull.* 42 (2001) 895.
- [69] C. M. Reddy, J. G. Quinn, *Mar. Pollut. Bull.* 38 (1999) 126.

- [70] B. Pérez-Cadahía, B. Laffon, E. Pásaro, J. Méndez, *Comp. Biochem. Physiol. C* 138 (2004) 453.
- [71] J. Koyama, S. Uno, K. Kohno, *Mar. Pollut. Bull.* 49 (2004) 1054.
- [72] E. Manoli, A. Kouras, C. Samara, *Chemosphere* 56 (2004) 867.
- [73] S.-J. Chen, H.-B. Su, J.-E. Chang, W.-J. Lee, K.-L. Huang, L.-T. Hsieh, Y.-C. Huang, W.-Y. Lin, C.-C. Lin, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 1209.
- [74] W. Jiao, Y. Lu, J. Li, J. Han, T. Wang, W. Luo, Y. Shi, G. Wang, *Environ. Monit. Assess.* 158 (2009) 581.
- [75] R. J. Law, C. A. Kelly, K. L. Baker, K. H. Langford, T. Bartlett, *Mar. Pollut. Bull.* 44 (2002) 903.
- [76] P. S. Rao, M. F. Ansari, P. Pipalatkhar, A. Kumar, P. Nema, S. Devotta, *Environ. Monit. Assess.* 137 (2008) 387.
- [77] E. G. Sanderson, J.-P. Farant, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 5350.
- [78] C.-J. Tsai, M.-L. Chen, K.-F. Chang, F.-K. Chang, I.-F. Mao, *Chemosphere* 74 (2009) 1104.
- [79] H.-H. Yang, S.-O. Lai, L.-T. Hsieh, H.-J. Hsueh, T.-W. Chi, *Chemosphere* 48 (2002) 1061.
- [80] S. V. Kakareka, T. I. Kukharchyk, *Sci. Total Environ.* 308 (2003) 257.
- [81] M. Quintero, A. Moncada, *Región y Sociedad* 43 (2008) 3.
- [82] M. Kalaitzoglou, E. Terzi, C. Samara, *Atmos. Environ.* 38 (2004) 2545.
- [83] H. Keshtkar, L. L. Ashbaugh, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 2729.
- [84] M. Brauer, Health impacts of biomass air pollution, Report prepared for the biregional workshop on health impacts of haze-related air pollution, Kuala Lumpur, Malaysia (1998). http://www.cher.ubc.ca/PDFs/biomass_air.pdf
- [85] C.-H. Lai, K.-S. Chen, H.-K. Wang, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 1200.
- [86] A. F. L. Godoi, K. Ravindra, R. H. M. Godoi, S. J. Andrade, M. Santiago-Silva, L. Van Vaeck, R. Van Grieken, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 49.
- [87] B. M. Jenkins, A. D. Jones, S. Q. Turn, R. B. Williams, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 2462.

- [88] A. D. Pereira Netto, I. F. Cunha, T. M. Krauss, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73 (2004) 1072.
- [89] C. A. Menzie, B. B. Potocki, J. Santodonato, *Environ. Sci. Technol.* 26 (1992) 1278.
- [90] P. E. T. Douben, *PAHs: An Ecotoxicological Perspective*, John Wiley & Sons Ltd, England (2003).
- [91] N. Ohkouchi, K. Kawamura, H. Kawahata, *Environ. Sci. Technol.* 33 (1999) 3086.
- [92] P. Masclet, V. Hoyau, J. L. Jaffrezo, H. Cachier, *Atmos. Environ.* 34 (2000) 3195.
- [93] P. Fernández, G. Carrera, J. O. Grimalt, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3261.
- [94] L. Jiao, G. L. Zheng, T. B. Minh, B. Richardson, L. Chen, Y. Zhang, L. W. Yeung, J. C. W. Lam, X. Yang, P. K. S. Lam, M. H. Wang, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 1342.
- [95] W. Wilcke, M. Krauss, J. Lilienfein, W. Amelung, *J. Environ. Qual.* 33 (2004) 946.
- [96] A. M. Mastral, M. S. Callén, J. M. López, R. Murillo, T. García, M. V. Navarro, *Fuel Process. Technol.* 80 (2003) 183.
- [97] D. A. Olson, J. Turlington, R. M. Duvall, S. R. McDow, C. D. Stevens, R. Williams, *Atmos. Environ.* 42 (2008) 1742.
- [98] R. Fertmann, I. Tesseraux, M. Schümann, H. Neus, *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.* 12 (2002) 115.
- [99] S. N. Meijer, A. J. Sweetman, C. J. Halsall, K. C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 3213.
- [100] L. Zhu, H. Lu, S. Chen, T. Amagai, *J. Hazard. Mat.* 162 (2009) 1165.
- [101] F. A. Ansari, A. H. Khan, D. K. Patel, H. Siddiqui, S. Sharame, M. Ashquin, I. Ahmad, *Environ. Monit. Assess.* (2009) Online, doi: 10.1007/s10661-009-1249-2.
- [102] L. F. C. S. Marques, G. Arbilla, S. L. Quiterio, M. C. S. Machado, *J. Braz. Chem. Soc.* 20 (2009) 518.
- [103] S.-D. Choi, C. Shunthirasingham, G. L. Daly, H. Xiao, Y. D. Lei, F. Wania, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 3199.

- [104] M. P. K. Choi, Y. H. Kang, X. L. Peng, K. W. Ng, M. H. Wong, *Chemosphere* 77 (2009) 714.
- [105] W. Wang, S. Tao, W. Wang, G. Shen, J. Zhao, K.-C. Lam, *J. Environ. Sci. Health. Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 44 (2009) 854.
- [106] M. R. Ras, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1051.
- [107] E. C. Santiago, M. G. Cayetano, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 4138.
- [108] P. S. Khillare, T. Agarwal, V. Shridhar, *Environ. Monit. Assess.* 147 (2008) 223.
- [109] T. T. Hien, P. P. Nam, S. Yasuhiro, K. Takayuki, T. Norimichi, B. Hiroshi, *Sci. Total Environ.* 382 (2007) 70.
- [110] N. Y. M. J. Omar, T. C. Mon, N. A. Rahman, M. R. B. Abas, *Sci. Total Environ.* 369 (2006) 76.
- [111] G.-C. Fang, K.-F. Chang, C. Lu, H. Bai, *Chemosphere* 55 (2004) 787.
- [112] F. Esen, S. S. Cindoruk, Y. Tasdemir, *Environ. Pollut.* 152 (2008) 461.
- [113] A. Bozlaker, A. Muezzinoglu, M. Odabasi, *J. Hazard. Mat.* 153 (2008) 1093.
- [114] Y. Tasdemir, F. Esen, *Atmos. Environ.* 41 (2007) 1288.
- [115] E. Manoli, C. Samara, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 417.
- [116] L. G. Peteiro, U. Labarta, M. J. Fernández-Reiriz, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 145 (2007) 588.
- [117] M. I. Badawy, M. A. Emababy, *Desalination* 251 (2010) 34.
- [118] H. Deyin, P. Ping'an, X. Yigang, D. Yunyun, D. Hongmei, *J. Environ. Sci.* 21 (2009) 654.
- [119] J. J. González, L. Viñas, M. A. Franco, J. Fumega, J. A. Soriano, G. Grueiro, S. Muniategui, P. López-Mahía, D. Prada, J. M. Bayona, R. Alzaga, J. Albaigés, *Mar. Pollut. Bull.* 53 (2006) 250.
- [120] R. Pietzsch, S. R. Patchineelam, J. P. M. Torres, *Mar. Chem.* 118 (2010) 56.
- [121] M. Notar, H. Leskovšek, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 846.
- [122] J.-H. Sun, G.-L. Wang, Y. Chai, G. Zhang, J. Li, J. Feng, *Ecotox. Environ. Safe* 72 (2009) 1614.

- [123] B. Johnson-Restrepo, J. Olivero-Verbel, S. Lu, J. Guette-Fernández, R. Baldiris-Avila, I. O'Byrne-Hoyos, K. M. Aldous, R. Addink, K. Kannan, *Environ. Pollut.* 151 (2008) 452.
- [124] E. Cortazar, L. Bartolomé, S. Arrasate, A. Usobiaga, J. C. Raposo, O. Zuloaga, N. Etxebarria, *Chemosphere* 72 (2008) 1467.
- [125] M. S. García-Falcón, B. Cancho-Grande, J. Simal-Gándara, *Water Res.* 38 (2004) 1679.
- [126] Y. Ma, J. Chen, F. Jiao, K. Duo, Z. Rong, M. Li, W. Wang, *Environ. Monit. Assess.* 146 (2008) 127.
- [127] B. Chen, X. Xuan, L. Zhu, J. Wang, Y. Gao, K. Yang, X. Shen, B. Lou, *Water Res.* 38 (2004) 3558.
- [128] A. Ballesteros-Gómez, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *J. Chromatogr. A* 1203 (2008) 168.
- [129] A. Masih, R. Saini, A. Taneja, *Int. J. Water* 4 (2008) 136.
- [130] O. Delhomme, E. Rieb, M. Millet, *Chromatographia* 65 (2007) 163.
- [131] M. Bourdat-Deschamps, J.-J. Daudin, E. Barriuso, *J. Chromatogr. A* 1167 (2007) 143.
- [132] M. A. Olivella, *Chemosphere* 63 (2006) 116.
- [133] C. Basheer, R. Balasubramanian, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 11.
- [134] A. H. Arias, C. V. Spetter, R. H. Freije, J. E. Marcovecchio, *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85 (2009) 67.
- [135] I. Zrafi-Nouira, Z. Khedir-Ghenim, R. Bahri, I. Cheraeif, M. Rouabhia, D. Saidane-Mosbahi, *Water Air Soil Pollut.* 202 (2009) 19.
- [136] J. Li, X. Shang, Z. Zhao, R. L. Tanguay, Q. Dong, C. Huang, *J. Hazard. Mater.* 173 (2010) 75.
- [137] F. Busetti, A. Heitz, M. Cuomo, S. Badoer, P. Traverso, *J. Chromatogr. A* 1102 (2006) 104.
- [138] A. Jiries, H. Hussein, J. Lintelmann, *Water Air Soil Pollut.* 121 (2000) 217.

- [139] C. Vogelsang, M. Grung, T. G. Jantsch, K. E. Tollefsen, H. Liltved, *Water Res.* 40 (2006) 3559.
- [140] H. S. Jahin, B. N. Barsoum, T. A. Tawfic, J. V. Headley, *J. Environ. Sci. Health. Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 44 (2009) 1237.
- [141] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, A. Gelencsér, Z. Krivácsy, Á. Molnár, J. Hlavay, *Chromatographia* 48 (1998) 149.
- [142] D. M. Brum, R. J. Cassella, A. D. Pereira Netto, *Talanta* 74 (2008) 1392.
- [143] J. R. M. Ross, D. R. Oros, *Chemosphere* 57 (2004) 909.
- [144] B. Men, M. He, L. Tan, C. Lin, X. Quan, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 818.
- [145] Q. Shen, K. Y. Wang, W. Zhang, S. C. Zhang, X. J. Wang, *Environ. Geochem. Health* 31 (2009) 453.
- [146] D. W. Kim, S. K. Kim, D. S. Lee, *J. Environ. Monit.* 11 (2009) 1244.
- [147] P. Nagy, J. Fekete, V. K. Sharma, *J. Environ. Sci. Health. Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 42 (2007) 231.
- [148] H. Nakata, Y. Sakai, T. Miyawaki, A. Takemura, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 3513.
- [149] L. R. Bordajandi, G. Gómez, E. Abad, J. Rivera, M. M. Fernández-Bastón, J. Blasco, M. J. González, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 992.
- [150] A. Binelli, A. Provini, *Ecotox. Environ. Safe.* 58 (2004) 139.
- [151] R. Martí-Cid, J. M. Llobet, V. Castell, J. L. Domingo, *Food Chem. Toxicol.* 46 (2008) 3163.
- [152] K. C. Cheung, H. M. Leung, K. Y. Kong, M. H. Wong, *Chemosphere* 66 (2007) 460.
- [153] M. J. Ramalhosa, P. Paíga, S. Morais, C. Delerue-Matos, M. B. Prior Pinto Oliveira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 3529.
- [154] A. Malik, P. Ojha, K. P. Singh, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80 (2008) 134.
- [155] N. Loutfy, M. Fuerhacker, P. Tundo, S. Raccanelli, M. Tawfic Ahmed, *Chemosphere* 66 (2007) 1962.
- [156] G. Hu, C. Sun, J. Li, Y. Zhao, H. Wang, Y. Li, *Ecotoxicology* 18 (2009) 647.

- [157] J. K. H. Fang, D. W. T. Au, R. S. S. Wu, G. J. Zhen, A. K. Y. Chan, P. K. S. Lam, P. K. S. Shin, *Mar. Pollut. Bull.* 58 (2009) 601.
- [158] M. D. L. Easton, D. Luszniak, E. Von der Geest, *Chemosphere* 46 (2002) 1053.
- [159] J. Harvey, L. Harwell, J. K. Summers, *Environ. Monit. Assess.* 137 (2008) 403.
- [160] Y. T. Li, F. B. Li, J. J. Chen, G. Y. Yang, H. F. Wan, T. B. Zhang, X. D. Zeng, J. M. Liu, *Environ. Monit. Assess.* 139 (2008) 61.
- [161] M. C. Rojo-Camargo, M. C. F. Toledo, *Food Control* 14 (2003) 49.
- [162] M. Jánská, J. Hajšlová, M. Tomaniová, V. Kocourek, M. Vávrová, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77 (2006) 492.
- [163] S. Moret, L. S. Conte, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 245.
- [164] S. Moret, L. Conte, D. Dean, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1367.
- [165] B. H. Chen, Y. C. Chen, *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5238.
- [166] A. Stołyhwo, Z. E. Sikorski, *Food Chem.* 91 (2005) 303.
- [167] I. Aparicio, J. L. Santos, E. Alonso, *Waste Manage.* 29 (2009) 1747.
- [168] H. R. Rogers, *Sci. Total Environ.* 185 (1996) 3.
- [169] S. Pérez, M. Guillamón, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 57.
- [170] Q.-Y. Cai, C.-H. Mo, Q.-T. Wu, Q.-Y. Zeng, A. Katsoyiannis, *Chemosphere* 68 (2007) 1751.
- [171] L. Hua, W.-X. Wu, Y.-X. Liu, C. M. Tientchen, Y.-X. Chen, *Biomed. Environ. Sci.* 21 (2008) 345.
- [172] J. Dai, M. Xu, J. Chen, X. Yang, Z. Ke, *Chemosphere* 66 (2007) 353.
- [173] R.-Y. Shen, Y.-M. Luo, G.-Y. Zhang, Y. Teng, Z.-G. Li, L.-H. Wu, *Pedosphere* 17 (2007) 373.
- [174] J.-H. Ju, I.-S. Lee, W.-J. Sim, H. Eun, J.-E. Oh, *Chemosphere* 74 (2009) 441.
- [175] J. M. Moreda, A. Arranz, S. Fernández de Betoño, A. Cid, J. F. Arranz, *Sci. Total Environ.* 220 (1998) 33.

- [176] E. Abad, K. Martínez, C. Planas, O. Palacios, J. Caixach, J. Rivera, *Chemosphere* 61 (2005) 1358.
- [177] P. Villar, M. Callejón, E. Alonso, J. C. Jiménez, A. Guiraúm, *Chemosphere* 64 (2006) 535.
- [178] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 1148 (2007) 219.
- [179] J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, *Anal. Chim. Acta* 605 (2007) 102.
- [180] M. Blanchard, M. J. Teil, D. Ollivon, L. Legenti, M. Chevreuil, *Environ. Res.* 95 (2004) 184.
- [181] L. Mansuy-Huault, A. Regier, P. Faure, *Chemosphere* 75 (2009) 995.
- [182] M. I. H. Helaleh, A. Al-Omair, A. Nisar, B. Gevao, *J. Chromatogr. A* 1083 (2005) 153.
- [183] S. Baran, P. Oleszczuk, *Pol. J. Environ. Stud.* 12 (2003) 523.
- [184] M. Włodarczyk-Makula, *J. Environ. Sci. Health. Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 43 (2008) 1602.
- [185] J. L. Stevens, G. L. Northcott, G. A. Stern, G. T. Tomy, K. C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 462.
- [186] J. D. Berset, R. Holzer, *J. Chromatogr. A* 852 (1999) 545.
- [187] A. L. Juhasz, E. Smith, N. Waller, R. Stewart, J. Weber, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 585.
- [188] Y.-F. Jiang, X.-T. Wang, F. Wang, Y. Jia, M.-H. Wu, G.-Y. Sheng, J.-M. Fu, *Chemosphere* 75 (2009) 1112.
- [189] X. Tang, C. Shen, D. Shi, S. A. Cheema, M. I. Khan, C. Zhang, Y. Chen, *J. Hazard. Mater.* 173 (2010) 653.
- [190] X. Li, P. Li, X. Lin, Z. Gong, S. Fan, L. Zheng, E. A. Verkhozina, *Environ. Monit. Assess.* 143 (2008) 257.
- [191] J.-Y. Cho, J. G. Son, B.-J. Park, B.-Y. Chung, *Environ. Monit. Assess.* 149 (2009) 385.
- [192] J. J. Nam, B. H. Song, K. C. Eom, S. H. Lee, A. Smith, *Chemosphere* 50 (2003) 1281.

- [193] E. Morillo, A. S. Romero, C. Maqueda, L. Madrid, F. Ajmone-Marsan, H. Grčman, C. M. Davidson, A. S. Hursthouse, J. Villaverde, J. Environ. Monit. 9 (2007) 1001.
- [194] J. L. Martínez, A. Garrido, M. N. Barco-Bonilla, R. Romero-González, J. A. Padilla, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1551.
- [195] R. J. De la Torre-Roche, W.-Y. Lee, S. I. Campos-Díaz, J. Hazard. Mater. 163 (2009) 946.
- [196] T. Agarwal, J. Hazard. Mater. 171 (2009) 894.
- [197] S. Ray, P. S. Khillare, T. Agarwal, V. Shridhar, J. Hazard. Mater. 156 (2008) 9.
- [198] S. Moret, G. Purcaro, L. S. Conte, Sci. Total Environ. 386 (2007) 1.
- [199] S. Orecchio, J. Hazard. Mater. 173 (2010) 358.
- [200] S. Goto, D. Nagaosa, S. Kageyama, D. Nakajima, S. Mineki, T. Yamamura, O. Endo, K. Kohzaki, Y. Takagi, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83 (2009) 742.
- [201] O. S. S. Sojinu, J.-Z. Wang, O. O. Sonibare, E. Y. Zeng, J. Hazard. Mater. 174 (2010) 641.
- [202] G. R. E. E. Ana, M. K. C. Sridhar, G. O. Emerole, Afr. J. Pure Appl. Chem. 3 (2009) 31.
- [203] R. C. Brändli, T. Hartnik, T. Henriksen, G. Cornelissen, Chemosphere 73 (2008) 1805.
- [204] J. J. Nam, G. O. Thomas, F. M. Jaward, E. Steinnes, O. Gustafsson, K. C. Jones, Chemosphere 70 (2008) 1596.
- [205] A. Khan, M. Ishaq, M. A. Khan, Environ. Monit. Assess. 137 (2008) 363.
- [206] L. Quinn, R. Pieters, C. Nieuwoudt, A. R. Borgen, H. Kylin, H. Bouwman, J. Environ. Monit. 11 (2009) 1647.
- [207] A. Desaulles, S. Ammann, F. Blum, R. C. Brändli, T. D. Bucheli, A. Keller, J. Environ. Monit. 10 (2008) 1265.
- [208] A. Vyskocil, Z. Fiala, V. Chénier, V. Krajak, E. Ettlerova, J. Bukac, C. Viau, S. Emminger, Environ. Toxicol. Pharm. 8 (2000) 111.

- [209] Health Protection Agency, Compendium of Chemical Hazards, Polycyclic aromatic hydrocarbons (Benzo[a]pyrene), 1^a ed., United Kingdom (2008).
- [210] Y.V. Pashin, L.M. Bakhitova, Environ. Health Persp. 30 (1979) 185.
- [211] A.H. Neilson, The Handbook of Environmental Chemistry, 3, Part J, PAHs and Related Compounds (Biology), Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York(1998).
- [212] S. K. Samanta, O. V. Singh, R. K. Jain, Trends Biotechnol. 20 (2002) 243.
- [213] D. Belpomme, P. Irigaray, L. Hardell, R. Clapp, L. Montagnier, S. Epstein, A. J. Sasco, Environ. Res. 105 (2007) 414.
- [214] P. Pott, Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer scrotum, the different kinds of ruptures and the mortification of the toes and feet, Hawkes, Clack and Collins, London (1775).
- [215] G. Koss, I. Tesseraux, Hydrocarbons, In Toxicology, Ed. H. Marquardt, S. G. Schafer, R. McClellan, F. Welsh, Academic Press, California (1999) 603-609.
- [216] M. Pufulete, J. Battershill, A. Boobis, R. Fielder, Regul. Toxicol. Pharm. 40 (2004) 54.
- [217] G. Wagner, History of cancer registration, In Cancer registration, principles and methods, Ed. O. M. Jensen, R. MacLennan, C. S. Muir, R. G. Skeet, IARC Scientific Publications n° 95, Lyon (1991).
- [218] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 3, Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and heterocyclic compounds (1973). <http://monographs.iarc.fr>.
- [219] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 32, Polynuclear Aromatic Compounds Part 1: Chemical, Environmental and Experimental Data (1983). <http://monographs.iarc.fr>.
- [220] IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Air Pollution, Part 1, vol 92, Some Non-heterocyclic PAHs and related industrial exposures, In preparation (2008). <http://monographs.iarc.fr/ENG/Meetings/92-pahs.pdf>
- [221] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 33, Polynuclear Aromatic Compounds Part 2: Carbon blacks, mineral oils (lubricant base oils and derived products) and some nitroarenes (1984). <http://monographs.iarc.fr>

BIBLIOGRAFÍA

- [222] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 34, Polynuclear Aromatic Compounds Part 3: Industrial exposures in aluminium production, coal gasification, coke production and iron and steel founding (1984). <http://monographs.iarc.fr>
- [223] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 35, Polynuclear Aromatic Compounds Part 4: Bitumens, coal-tras and derived products, shale-oils and soots (1985). <http://monographs.iarc.fr>
- [224] IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans, vol 38, Tobacco smoking (1986). <http://monographs.iarc.fr>
- [225] Environmental Protection Agency, National Priorities List, <http://www.epa.gov/superfund/sites/npl/index.htm>
- [226] Environmental Protection Agency, Evaluation and Estimation of Potential Carcinogenic Risks of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Office of Health and Environmental Assessment, Washington (1985).
- [227] Integrated Risk Information System (IRIS), (1999) <http://www.epa.gov/iris/subst/index.html>
- [228] Environmental Protection Agency, Health Effects Assessment for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), EPA-540/1-86-013, Chicago (1984).
- [229] ATSDR, CERCLA Priority List of Hazardous Substances (2007) <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>
- [230] Report on Carcinogens, Eleventh Edition; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program (2009). <http://www.ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s150pah.pdf>
- [231] I. Vives, J.O. Grimalt, R. Guitart, Apuntes de Ciencia y Tecnología 3 (2001) 45.
- [232] C. Rubio, R. Álvarez, A. Hardisson, Rev. Toxicol. 23 (2006) 1.
- [233] G. León, L. E. Pérez, J. C. Linares, A. Hartmann, M. Quintana, Mutat. Res. 630 (2007) 42.
- [234] M. Ianistcki, J. Dallarosa, C. Sauer, C. E. Teixeira, J. da Silva, Environ. Pollut. 157 (2009) 2037.

- [235] D. Chakravarti, D. Venugopal, P.C. Mailander, J. L. Meza, S. Higginbotham, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan, *Mutat. Res.* 649 (2008) 161.
- [236] D. Martineau, K. Lemberger, A. Dallaire, P. Labelle, T. P. Lipscomb, P. Michel, I. Mikaelian, *Environ. Health Perspect.* 110 (2002) 285.
- [237] P. B. Farmer, R. Singh, B. Kaur, R. J. Sram, B. Binkova, I. Kalina, T. A. Popov, S. Garte, E. Taioli, A. Gabelova, A. Cebulska-Wasilewska, *Mutat. Res.* 544 (2003) 397.
- [238] G. Mastrangelo, E. Fadda, V. Marzia, *Environ. Health Perspect.* 104 (1996) 1166.
- [239] G. Pan, T. Hanaoka, Y. Yamano, K. Hara, M. Ichiba, Y. Wang, J. Zhang, Y. Feng, Z. Shujuan, D. Guan, G. Gao, N. Liu, K. Takahashi, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1963.
- [240] D. L. Tang, A. Rundle, D. Warburton, R. M. Santella, W.-Y. Tsai, S. Chiamprasert, Y. Z. Hsu, F. P. Perera, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1949.
- [241] J. R. Weiss, K. B. Moysich, H. Swede, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14 (2005) 20.
- [242] A. Rundle, D. Tang, H. Hibshoosh, F. Schnabel, A. Kelly, R. Levine, J. Zhou, B. Link, F. Perera, *Environ. Mol. Mutagen.* 39 (2002) 201.
- [243] B. A. Rybicki, N. L. Nock, A. T. Savera, D. Tang, A. Rundle, *Cancer Lett.* 239 (2006) 157.
- [244] A. Vyskocil, C. Viau, M. Camus, *Hum. Exp. Toxicol.* 23 (2004) 115.
- [245] S. Wang, S. Chanock, D. Tang, Z. Li, W. Jedrychowski, F. P. Perera, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 17 (2008) 405.
- [246] F. Halek, G. Nabi, A. Kavousi, *Environ. Monit. Assess.* 143 (2008) 303.
- [247] R. T. Gamboa, A. R. Gamboa, A. H. Bravo, W. P. Ostrosky, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 5 (2008) 349.
- [248] S. Cordier, C. Monfort, G. Filippini, S. Preston-Martin, F. Lubin, B.A. Mueller, E.A. Holly, R. Peris-Bonet, M. McCredie, W. Choi, J. Little, A. Arslan, *Am. J. Epidemiol.* 159 (2004) 1109.

- [249] S. Cordier, B. Lefevre, G. Filippini, R. Peris-Bonet, M. Farinotti, G. Lovicu, L. Mandereau, *Cancer Causes Control* 8 (1997) 688.
- [250] G. Filippini, P. Maisonneuve, M. McCredie, R. Peris-Bonet, B. Modan, S. Preston-Martin, B. A. Mueller, E. A. Holly, S. Cordier, N. W. Choi, J. Little, A. Arslan, P. Boyle, *Int. J. Cancer* 100 (2002) 206.
- [251] T. R. Church, K. E. Anderson, N. E. Caporaso, M. S. Geisser, C. T. Le, Y. Zhang, A. R. Benoit, S. G. Carmella, S. S. Hecht, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18 (2009) 260.
- [252] R. Mancini, G. Romano, A. Sgambato, G. Flamini, M. R. Giovagnoli, A. Boninsegna, C. Carraro, A. Vecchione, A. Cittadini, *Gynecol. Oncol.* 75 (1999) 68.
- [253] B. Marczynski, B. Pesch, M. Wilhelm, B. Rossbach, R. Preuss, J.-U. Hahn, S. Rabstein, M. Raulf-Heimsoth, A. Seidel, H.-P. Rihs, A. Adams, M. Scherenberg, A. Erkes, B. Engelhardt, K. Straif, H. U. Käfferlein, J. Angerer, T. Brüning, *Arch. Toxicol.* 83 (2009) 947.
- [254] S. Mukherjee, L. J. Palmer, J. Y. Kim, D. B. Aeschliman, R. S. Houk, M. A. Woodin, D. C. Christiani, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13 (2004) 454.
- [255] P. Boffeta, N. Jourenkova, P. Gustavsson, *Cancer Causes Control* 8 (1997) 444.
- [256] B. Armstrong, E. Hutchinson, J. Unwin, T. Fletcher, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 970.
- [257] P. Gustavsson, A. Gustavsson, C. Hogsedt, *Br. J. Ind. Med.* 45 (1988) 777.
- [258] J. Lewtas, *Mutat. Res.* 636 (2007) 95.
- [259] R. J. Šrám, B. Binková, P. Rössner, J. Rubeš, J. Topinka, J. Dejmek, *Mutat. Res.* 428 (1999) 203.
- [260] S. Hombach-Klonisch, P. Pocar, S. Kietz, T. Klonisch, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 599.
- [261] L. Gaspari, S.-S. Chang, R. M. Santella, S. Garte, P. Pedotti, E. Taioli, *Mutat. Res.* 535 (2003) 155.
- [262] Y. Han, Y. Xia, P. Zhu, S. Qiao, R. Zhao, N. Jin, S. Wang, L. Song, G. Fu, X. Wang, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 768.

- [263] H. A. Jeng, L. Yu, J. Environ. Sci. Health. Part A Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng. 43 (2008) 675.
- [264] Y. Xia, P. Zhu, Y. Han, C. Lu, S. Wang, A. Gu, G. Fu, R. Zhao, L. Song, X. Wang, Hum. Reprod. 24 (2009) 1067.
- [265] H. Choi, W. Jedrychowski, J. Spengler, D. E. Camann, R. M. Whyatt, V. Rauh, W.-Y. Tsai, F. P. Perera, Environ. Health Perspect. 11 (2006) 1744.
- [266] P. A. Fowler, S. Cassie, S. M. Rhind, M. J. Brewer, J. M. Collinson, R. G. Lea, P. J. Baker, S. Bhattacharya, P. J. O'Shaughnessy, J. Clin. Endocrinol. Metab. 93 (2008) 619.
- [267] F. P. Perera, W. Jedrychowski, V. Rauh, R. M. Whyatt, Environ. Health Persp. 107 (1999) 451.
- [268] D. Tang, T. Li, J. J. Liu, Y. Chen, L. Qu, F. Perera, Environ. Health Perspect. 114 (2006) 1297.
- [269] Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo, Oficina Internacional del Trabajo (1998).
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo4/104_07.pdf
- [270] J. Jacob, Polycyclic Aromat. Compd. 28 (2008) 242.
- [271] D. L. Harris, A. C. Huderson, M. S. Niaz, J. J. Ford, A. E. Archibong, A. Ramesh, Environ. Toxicol. 24 (2008) 603.
- [272] K. Bekki, H. Takigami, G. Suzuki, N. Tang, K. Hayakawa, J. Health Sci. 55 (2009) 601.
- [273] J. Jacob, Pure Appl. Chem. 68 (1996) 301.
- [274] L. A. Hooven, W. M. Baird, Toxicology 249 (2008) 1.
- [275] R. Barhoumi, J. M. Catania, A. R. Parrish, I. Awooda, E. Tiffany-Castiglioni, S. Safe, R. C. Burghardt, J. Toxicol. Sci. 34 (2009) 13.
- [276] K. Skupinska, I. Misiewicz-Krzeminska, K. Lubelska, T. Kasprzycka-Guttman, Toxicol. in Vitro 23 (2009) 763.
- [277] W. Jiang, L. Wang, W. Zhang, R. Coffe, I. S. Fazili, B. Moorthy, Biochem. Biophys. Res. Commun. 390 (2009) 1419.

[278] W. Shober, G. Pusch, S. Oeder, H. Reindl, H. Behrendt, J. T. M. Buters, Chem. Biol. Interact. 183 (2010) 57.

[279] World Health Organization, Air Quality Guidelines, 2ª ed., Chapter 5.9, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Copenhagen, Denmark (2000). http://www.euro.who.int/document/aig/5_9pah.pdf

[280] United States Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Standards (2009). <http://www.epa.gov/safewater/consumer/pdf/mcl.pdf>

[281] World Health Organization, Guidelines for Drinking Water Quality, Vol 1, Geneva (2008).

[282] Unión Europea, Directiva 98/83/CE del Consejo del 3 de Noviembre de 1998 sobre la calidad de las aguas destinadas al consumo humano, Diario Oficial de las Comunidades Europeas, L330/32.

[283] Unión Europea, Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, Diario Oficial de la Unión Europea, L348/84.

[284] Unión Europea, Reglamento (CE) Nº 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios, Diario Oficial de la Unión Europea, L364/22.

[285] Ministerio de la Presidencia (2001). Orden de 25 de julio de 2001 por la que se establecen límites de determinados hidrocarburos aromáticos policíclicos en aceite de orujo de oliva. BOE 175 de Jueves 26 de Julio de 2001.

[286] Informe sobre repercusiones del vertido del "Prestige" en la Seguridad Alimentaria, Agencia Española de Seguridad Alimentaria, Ministerio de Sanidad y Consumo, Madrid (2003).

[287] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Avis du groupd'experts réunis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'Erika, <http://www.labo-analytika.com/erika/a000205.pdf>, February 2000.

[288] Council of the European Community, Working document on Sludge, 3rd Draft, 27 de abril de 2000, Bruselas.

- [289] Journal officiel de la République Française (1998) 1563. Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boeas sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des asux usées.
- [290] H. Langenkamp, P. Part, W. Erhardt, A. Prüeß, Organic contaminants in sewage sludge for agricultural use, European Commission (2001). http://ec.europa.eu/environment/waste/sludge/pdf/organics_in_sludge.pdf
- [291] Ministerio de Presidencia (2005): REAL DECRETO 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, Boletín Oficial del Estado 15/2005, 1833-1843.
- [292] J. V. Tarazona, M. D. Fernández, M. Milagrosa-Vega, J. Soils Sediments 5 (2005) 121.
- [293] Unión Europea, Directiva 96/62/CE del Consejo de 27 de septiembre de 1996 sobre evaluación y gestión de la calidad del aire ambiente, Diario Oficial L296.
- [294] Unión Europea, Directiva 2004/107/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 15 de diciembre de 2004, relativa al arsénico, el cadmio, el mercurio, el níquel y los hidrocarburos aromáticos policíclicos en el aire ambiente, Diario Oficial de la Unión Europea, L23/3.
- [295] Real Decreto 665/1997 del 2 de mayo de 1997, publicado en el BOE n° 124 (24 mayo de 1997).
- [296] A. Motelay-Massei, D. Ollivon, B. Garban, M. Chevreuil, Atmos. Environ. 37 (2003) 3135.
- [297] B. O. Kwach, J. O. Lalah, Bull. Environ. Contam. Toxicol. 83 (2009) 727.
- [298] A. Filipkowska, L. Lubecki, G. Kowalewska, Anal. Chim. Acta 547 (2005) 243.
- [299] D. M. Brum, A. D. Pereira Netto, J. Hazard. Mat. 165 (2009) 447.
- [300] L. Pensado, E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, E. Martínez, A. M. Carro, R. Cela, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 121.
- [301] N. E. Díaz-Morales, H. J. Garza-Ulloa, R. Castro-Ríos, E. G. Ramírez-Villarreal, J. M. Barbarín-Castillo, M. L. Salazar-Cavazos, N. Waksman-de Torres, J. Chromatogr. Sci. 45 (2007) 57.

- [302] G. M. Titato, F. M. Lanças, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 28 (2005) 3045.
- [303] D. Ollivon, H. Blanchoud, A. Motelay-Massei, B. Garban, Atmos. Environ. 36 (2002) 2891.
- [304] US EPA, Method 550 – “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-liquid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection” (1990).
- [305] US EPA, Method 610 – “Polynuclear aromatic hydrocarbons. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater” (2001).
- [306] M. S. García-Falcón, M. Pérez-Lamela, J. Simal-Gándara, J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 6897.
- [307] P. W. Crozier, J. B. Plomley, L. Matchuk, Analyst 126 (2001) 1974.
- [308] W. Kanchanamayoon, N. Tatrahun, J. Environ. Sci. Technol. 2 (2009) 95.
- [309] E. Martínez, M. Gros, S. Lacorte, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1047 (2004) 181.
- [310] E. Pitarch, C. Medina, T. Portolés, F. J. López, F. Hernández, Anal. Chim. Acta 583 (2007) 246.
- [311] F. Werres, P. Balsaa, T. C. Schmidt, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 2235.
- [312] Y. He, H. K. Lee, J. Chromatogr. A 808 (1998) 79.
- [313] P. R. Kootstra, M. H. C. Straub, G. H. Stil, E. G. van der Velde, W. Hesselink, C. C. J. Land, J. Chromatogr. A 697 (1995) 123.
- [314] R. El Harrak, M. Calull, R. M. Marcé, F. Borrull, J. High Resol. Chromatogr. 21 (1998) 667.
- [315] S. Barrek, C. Cren-Olivé, L. Wiest, R. Baudot, C. Arnaudguilhem, M.-F. Grenier-Loustalot, Talanta 79 (2009) 712.
- [316] V. Matamoros, E. Jover, J. M. Bayona, Anal. Chem. 82 (2010) 699.
- [317] E. O. Gaga, S. G. Tuncel, Water Air Soil Pollut. 3 (2003) 127.
- [318] G. Kiss, Z. Varga-Puchony, J. Hlavay, J. Chromatogr. A 725 (1996) 261.
- [319] I. Urbe, J. Ruana, J. Chromatogr. A 778 (1997) 337.

- [320] L. Wolska, M. Rawa-Adkonis, J. Namieśnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1389.
- [321] R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 273.
- [322] US EPA, Method 550.1 – “Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water by liquid-solid extraction and HPLC with coupled ultraviolet and fluorescence detection” (1990).
- [323] T. Hyötyläinen, *Anal. Bioanal. Chem.* 394 (2009) 743.
- [324] L. Ramos, E. J. J. Ramos, U. A. Th. Brinkman, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (2005) 119.
- [325] S. Rubio, D. Pérez-Bendito, *Anal. Chem.* 81 (2009) 4601.
- [326] H. Liu, P. K. Dasgupta, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1817.
- [327] M. A. Jeannot, F. F. Cantwell, *Anal. Chem.* 68 (1996) 2236.
- [328] Y. He, H. K. Lee, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4634.
- [329] L. Xu, C. Basheer, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 184.
- [330] F. Pena-Pereira, I. Lavilla, C. Bendicho, *Spectrochim. Acta Part B* 64 (2009) 1.
- [331] E. Psillakis, N. Kalogerakis, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 53.
- [332] C. Yao, W. R. Pitner, J. L. Anderson, *Anal. Chem.* 81 (2009) 5054.
- [333] S. Shariati-Feizabadi, Y. Yamini, N. Bahramifar, *Anal. Chim. Acta* 489 (2003) 21.
- [334] L. Hou, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 377.
- [335] J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou, J. Hu, *Anal. Chem.* 75 (2003) 5870.
- [336] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, *J. Chromatogr. A* 1116 (2006) 1.
- [337] S. Berijani, Y. Assadi, M. Anbia, M.-R. M. Hosseini, E. Aghaee, *J. Chromatogr. A* 1123 (2006) 1.
- [338] M. Rezaee, Y. Yamini, M. Faraji, *J. Chromatogr. A* (2009), doi:10.1016/j.chroma.2009.11.088.
- [339] M. A. Farajzadeh, M. Bahram, J. Å. Jönsson, *Anal. Chim. Acta* 591 (2007) 69.

- [340] H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M. R. Ganjali, *J. Chromatogr. A* 1172 (2007) 105.
- [341] Y. C. Fan, Z. L. Hu, M. L. Chen, C. S. Tu, Y. Zhu, *Chin. Chem. Lett.* 19 (2008) 985.
- [342] X. Zang, J. Wang, O. Wang, M. Wang, J. Ma, G. Xi, Z. Wang, *Anal. Bioanal. Chem.* 392 (2008) 749.
- [343] J. Xia, B. Xiang, W. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 625 (2008) 28.
- [344] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1166 (2007) 9.
- [345] R. R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R. M. Hosseini, M. R. Jamali, *Talanta* 72 (2007) 387.
- [346] D. Nagaraju, S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 89.
- [347] Z. Xiao-Huan, W. Quiu-Hua, Z. Mei-Yue, X. Guo-Hong, W. Zhi, *Chin. J. Anal. Chem.* 37 (2009) 161.
- [348] R. R. Kozani, Y. Assadi, F. Shemirani, M.-R. M. Hosseini, M. R. Jamali, *Chromatographia* 66 (2007) 81.
- [349] N. Fattahi, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, E. Z. Jahromi, *J. Chromatogr. A* 1157 (2007) 23.
- [350] F. Rezaei, A. Bidari, A. P. Birjandi, M.-R. M. Hosseini, Y. Assadi, *J. Hazard. Mater.* 158 (2008) 621.
- [351] J.-S. Chiang, S.-D. Huang, *Talanta* 75 (2008) 70.
- [352] X. H. Zang, C. Wang, S. T. Gao, X. Zhou, Z. Wang, *Chin. J. Anal. Chem.* 36 (2008) 765.
- [353] M. B. Melwanki, M.-R. Fuh, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 24.
- [354] Y. Li, G. Wei, J. Hu, X. Liu, X. Zhao, X. Wang, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 96.
- [355] X. Wang, L. Fu, G. Wei, J. Hu, X. Zhao, X. Liu, Y. Li, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 2932.
- [356] C. Cortada, L. Vidal, R. Pastor, N. Santiago, A. Canals, *Anal. Chim. Acta* 649 (2009) 218.

- [357] R. Montes, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 205.
- [358] H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, F. Kamarei, Talanta 79 (2009) 1472.
- [359] Q. Wu, X. Zhou, Y. Li, X. Zang, C. Wang, Z. Wang, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 1755.
- [360] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 885.
- [361] L. Fu, X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, X. Wang, Anal. Chim. Acta 632 (2009) 289.
- [362] M. Rezaee, Y. Yamini, S. Shariati, A. Esrafil, M. Shamsipur, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 1511.
- [363] R. Maleki, N. M. Nezhad, N. Samadi, K. Farhadi, Microchim. Acta 165 (2009) 97.
- [364] T.-Y. Chou, S.-L. Lin, M.-R. Fuh, Talanta 80 (2009) 493.
- [365] Q. Zhou, L. Pang, G. Xie, J. Xiao, H. Bai, Anal. Sci. 25 (2009) 73.
- [366] Q. Zhou, L. Pang, J. Xiao, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6680.
- [367] J.-H. Guo, X.-H. Li, X.-L. Cao, Y. Li, X.-Z. Wang, X.-B. Xu, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 3038.
- [368] A. N. Anthemidis, K.-I. G. Ioannou, Talanta 80 (2009) 413.
- [369] E. Z. Jahromi, A. Bidari, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, M. R. Jamali, Anal. Chim. Acta 585 (2007) 305.
- [370] M. T. Naseri, M.-R. M. Hosseini, Y. Assadi, A. Kiani, Talanta 75 (2008) 56.
- [371] S. Kagaya, D. Takata, T. Yoshimori, T. Kanbara, K. Tohda, Talanta 80 (2010) 1364.
- [372] S. Z. Mohammadi, D. Afzali, M. A. Taher, Y. M. Baghelani, Microchim. Acta 168 (2010) 123.
- [373] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6459.
- [374] H. Xu, D. Song, Y. Cui, S. Hu, Q.-W. Yu, Y.-Q. Feng, Chromatographia 70 (2009) 775.

- [375] H. A. Mashayekhi, P. Abroomand-Azar, M. Saber-Tehrani, S. W. Husain, *Chromatographia* 71 (2010) 517.
- [376] A. Daneshfar, T. Khezeli, H. J. Lotfi, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 456.
- [377] H. Chen, H. Chen, J. Ying, J. Huang, L. Liao, *Anal. Chim. Acta* 632 (2009) 80.
- [378] L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, A. V. Herrera-Herrera, M. A. Rodríguez-Delgado, *Anal. Bioanal. Chem.* 395 (2009) 2387.
- [379] J. Hu, Y. Li, W. Zhang, H. Wang, C. Huang, M. Zhang, X. Wang, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 2103.
- [380] J. Hu, L. Fu, X. Zhao, X. Liu, H. Wang, X. Wang, L. Dai, *Anal. Chim. Acta* 640 (2009) 100.
- [381] L. Fu, X. Liu, J. Hu, X. Zhao, H. Wang, C. Huang, X. Wang, *Chromatographia* 70 (2009) 1697.
- [382] Q. Wu, C. Wang, Z. Liu, C. Wu, X. Zeng, J. Wen, Z. Wang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5504.
- [383] N. Fattahi, S. Samadi, Y. Assadi, M.-R. M. Hosseini, *J. Chromatogr. A* 1169 (2007) 63.
- [384] R.-S. Zhao, C.-P. Diao, Q.-F. Chen, X. Wang, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 1069.
- [385] X. Liu, J. Li, Z. Zhao, W. Zhang, K. Lin, C. Huang, X. Wang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 2220.
- [386] R. Montes, I. Rodríguez, M. Ramil, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5459.
- [387] M. R. K. Zanjani, Y. Yamini, S. Shariati, J. Å. Jönsson, *Anal. Chim. Acta* 585 (2007) 286.
- [388] H. Xu, Z. Ding, L. Lv, D. Song, Y.-Q. Feng, *Anal. Chim. Acta* 636 (2009) 28.
- [389] M. Rezaee, Y. Yamini, A. Khanchi, M. Faraji, A. Saleh, *J. Hazard. Mater.* (2010), doi:10.1016/j.jhazmat.2010.02.006.
- [390] M.-I. Leong, S.-D. Huang, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 8.
- [391] J. Regueiro, M. Llompart, C. García-Jares, J. C. García-Monteagudo, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1190 (2008) 27.

- [392] J. Regueiro, M. Llompart, E. Psillakis, J. C. García-Monteagudo, C. García-Jares, *Talanta* 79 (2009) 1387.
- [393] S. Ozcan, A. Tor, M.E. Aydin, *Water Res.* 43 (2009) 4269.
- [394] S. Ozcan, A. Tor, M.E. Aydin, *Anal. Chim. Acta* 647 (2009) 182.
- [395] A. Saleh, Y. Yamini, M. Faraji, M. Rezaee, M. Ghambarian, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6673.
- [396] A. R. Fontana, R. G. Wuilloud, L. D. Martínez, J. C. Altamirano, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 147.
- [397] K. R. Seddon, A. Stark, M.-J. Torres, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 2275.
- [398] M. J. Earle, K. R. Seddon, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391.
- [399] G. A. Baker, S. N. Baker, S. Pandey, F. V. Bright, *Analyst* 130 (2005) 800.
- [400] J. G. Huddleston, A. E. Visser, W. M. Reichert, H. D. Willauer, G. A. Broker, R. D. Rogers, *Green Chem.* 3 (2001) 156.
- [401] M. Koel, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 35 (2005) 177.
- [402] R. Liu, J. Liu, Y. Yin, X. Hu, G. Jiang, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 871.
- [403] J. Liu, J. Å. Jönsson, G. Jiang, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 20.
- [404] A. Berthod, S. Carda-Broch, *Ann. Marie Curie Fellowship* 3 (2004) 1.
- [405] M. J. Earle, K. R. Seddon, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1391.
- [406] T. Welton, *Chem. Rev.* 99 (1999) 2071.
- [407] Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao, *J. Chromatogr. A* 1177 (2008) 43.
- [408] Y. C. Fan, M. L. Chen, C. Shen-Tu, Y. Zhu, *J. Anal. Chem.* 64 (2009) 1017.
- [409] M. H. Mallah, F. Shemirani, M. G. Maragheh, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 1947.
- [410] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cardenas, M. Valcarcel, *Anal. Chem.* 80 (2008) 793.
- [411] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1209 (2008) 76.

- [412] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 5580.
- [413] A. Chisvert, I. P. Román, L. Vidal, A. Canals, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 1290.
- [414] S. Pedersen-Bjergaard, K. E. Rasmussen, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2650.
- [415] K.E. Rasmussen, S. Pedersen-Bjergaard, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 1.
- [416] S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 132.
- [417] X. Jiang, C. Basheer, J. Zhang, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 1087 (2005) 289.
- [418] Y. Li, Y. Xiong, J. Fang, L. Wang, Q. Liang, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6155.
- [419] B. Hauser, P. Popp, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 551.
- [420] M. Schellin, B. Hauser, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1040 (2004) 251.
- [421] B. Hauser, M. Schellin, P. Popp, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6029.
- [422] M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 37.
- [423] M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1020 (2003) 153.
- [424] R. Rodil, M. Schellin, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1163 (2007) 288.
- [425] A. Prieto, O. Telleira, N. Etxebarria, L. A. Fernández, A. Usobiaga, O. Zuloaga, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 1.
- [426] V. G. Zuin, M. Schellin, L. Montero, J. H. Yariwake, F. Augusto, P. Popp, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 180.
- [427] R. P. Belardi, J. B. Pawliszyn, *Water Pollut. Res. J. Can.* 24 (1989) 179
- [428] Y. Chen, Z. Guo, X. Wang, C. Qiu, *J. Chromatogr. A* 1184 (2008) 191.
- [429] T. Hyötyläinen, M.-L. Riekkola, *Anal. Chim. Acta* 614 (2008) 27.
- [430] H. Kataoka, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 339.
- [431] H. Bagheri, A. Salemi, *Chromatographia* 59 (2004) 501.
- [432] G. Ouyang, W. Zhao, L. Bragg, Z. Qin, M. Alaei, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 4026.

- [433] E. Coelho, C. Ferreira, C. M. M. Almeida, J. Braz. Chem. Soc. 19 (2009) 1084.
- [434] R. Stiles, I. Yang, R. L. Lippincott, E. Murphy, B. Buckley, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 2976.
- [435] M.-C. Wei, J.-F. Jen, Talanta 72 (2007) 1269.
- [436] H. Bagheri, E. Babanezhad, A. Es-Haghi, J. Chromatogr. A 1152 (2007) 168.
- [437] R. Doong, S. Chang, Y. Sun, J. Chromatogr. A 879 (2000) 177.
- [438] D. Zuazagoitia, E. Millán, R. García, Chromatographia 66 (2007) 773.
- [439] F. Bianchi, F. Bisceglie, M. Careri, S. Di Bernardino, A. Mangia, M. Musci, J. Chromatogr. A 1196-1197 (2008) 15.
- [440] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, J. Microcolumn Sep. 11 (1999) 737.
- [441] F. M. Lanças, M. E. Queiroz, P. Grossi, I. R. Olivares, J. Sep. Sci. 32 (2009) 813.
- [442] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L. A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, J. Chromatogr. A (2010), doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051.
- [443] F. Sánchez-Rojas, C. Bosch-Ojeda, J. M. Cano-Pavón, Chromatographia 69 (2009) 79.
- [444] M. Kawaguchi, R. Ito, Y. Hayatsu, H. Nakata, N. Sakui, N. Okanouchi, K. Saito, H. Yokota, S.-I. Izumi, T. Makino, H. Nakazawa, J. Pharm. Biomed. Anal. 40 (2006) 82.
- [445] V. León, J. Llorca-Pórcel, B. Álvarez, M. A. Cobollo, S. Muñoz, I. Valor, Anal. Chim. Acta 558 (2006) 261.
- [446] C. Huertas, J. Morillo, J. Usero, I. Gracia-Manarillo, Talanta 72 (2007) 1149.
- [447] Z. Qin, L. Bragg, G. Ouyang, J. Pawliszyn, J. Chromatogr. A 1196-1197 (2008) 89.
- [448] C. Yu, Z. Yao, B. Hu, Anal. Chim. Acta 641 (2009) 75.
- [449] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, Anal. Chim. Acta 436 (2001) 1.

- [450] S. Lacorte, J. Quintana, R. Tauler, F. Ventura, A. Tovar-Sánchez, C. M. Duarte, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 8581.
- [451] H. Tani, T. Kamidate, H. Watanabe, *J. Chromatogr. A* 780 (1997) 229.
- [452] F. H. Quina, W. L. Hinze, *Ind. Eng. Chem. Res.* 38 (1999) 4150.
- [453] R. Ferrer, J. L. Beltrán, J. Guiteras, *Anal. Chim. Acta* 330 (1996) 199.
- [454] I. Y. Goryacheva, S. N. Shtykov, A. S. Loginov, I. V. Panteleeva, *Anal. Bional. Chem.* 382 (2005) 1413.
- [455] D. Sicilia, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, N. Maniasso, E. A. G. Zagatto, *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 29.
- [456] D. Bai, J. Li, S. B. Chen, B.-H. Chen, *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 3936.
- [457] J.-L. Li, B.-H. Chen, *J. Colloid Interf. Sci.* 263 (2003) 625.
- [458] B. Yao, L. Yang, *Ind. Eng. Chem. Res.* 47 (2008) 3949.
- [459] M. D. Luque de Castro, L. E. García-Ayuso, *Anal. Chim. Acta* 369 (1998) 1.
- [460] J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, *Talanta* 64 (2004) 571.
- [461] N. Fidalgo-Used, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 590 (2007) 1.
- [462] R. Cela, R. A. Lorenzo, M. C. Casais, *Técnicas de separación en química analítica*, Ed. Síntesis, Madrid (2002).
- [463] Z. Khan, J. Troquet, C. Vachelard, *Int. J. Environ. Sci. Tech* 2 (2005) 275.
- [464] S. R. Wild, K. S. Waterhouse, S. P. McGrath, K. C. Jones, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1706.
- [465] G. Codina, M. T. Vaquero, L. Comellas, F. Broto-Puig, *J. Chromatogr. A* 673 (1994) 21.
- [466] D. Fabbri, I. Vassura, C.-G. Sun, C. E. Snape, C. McRae, A. E. Fallick, *Mar. Chem.* 84 (2003) 123.
- [467] I. Vassura, F. Foschini, V. Baravelli, D. Fabbri, *Chem. Ecol.* 21 (2005) 415.
- [468] K. Pointet, A. Milliet, *Chemosphere* 40 (2000) 293.
- [469] A. Al-Omair, M. I. H. Helaleh, *Chromatographia* 59 (2004) 715.

- [470] C. Miège, J. Dugay, M. C. Hennion, J. Chromatogr. A 995 (2003) 87.
- [471] N. Ratola, S. Lacorte, A. Alves, D. Barceló, J. Chromatogr. A 1114 (2006) 198.
- [472] I. Vives, J. O. Grimalt, J. Chromatogr. B 768 (2002) 247.
- [473] I. Vives, J. O. Grimalt, P. Fernández, B. Rosseland, Sci. Total Environ. 324 (2004) 67.
- [474] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, Anal. Chim. Acta 602 (2007) 211.
- [475] M. Jánská, M. Tomaniová, J. Hajšlová, V. Kocourek, Food Addit. Contam. 23 (2006) 309.
- [476] Q.-Y. Cai, C.-H. Mo, Q.-T. Wu, Q.-Y. Zeng, A. Katsoyiannis, J. Chromatogr. A 1143 (2007) 207.
- [477] J. L. Luque-García, M. D. Luque de Castro, Trends Anal. Chem. 22 (2003) 41.
- [478] G. Romanik, E. Gilgenast, A. Przyjazni, M. Kamiński, J. Biochem. Biophys. Meth. 70 (2007) 253.
- [479] M. D. Luque de Castro, F. Priego-Capote, Talanta 72 (2007) 321.
- [480] F. Priego-Capote, M. D. Luque de Casto, Trends Anal. Chem. 23 (2004) 644.
- [481] H. M. Santos, J. L. Capelo, Talanta 73 (2007) 795.
- [482] K. Ridgway, S. P. Lalljie, R. M. Smith, J. Chromatogr. A 1153 (2007) 36.
- [483] P. Oleszczuk, S. Baran, Commun. Soil Sci. Plant Anal. 36 (2005) 1083.
- [484] P. Oleszczuk, S. Baran, J. Environ. Sci. Health 40 (2005) 2085.
- [485] P. Rodríguez-Sanmartín, A. Moreda-Piñeiro, A. Bermejo-Barrera, P. Bermejo-Barrera, Talanta 66 (2005) 683.
- [486] N. Barco-Bonilla, J. L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, R. Romero-González, Talanta 78 (2009) 156.
- [487] L. Lazzari, L. Sperti, M. Salizzato, B. Pavoni, Chemosphere 38 (1999) 1925.
- [488] L. Rey-Salgueiro, X. Pontevedra-Pombal, M. Álvarez-Casas, E. Martínez-Carballo, M. S. García-Falcón, J. Simal-Gándara, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5235.
- [489] P. Navarro, N. Etxebarria, G. Arana, Anal. Chim. Acta 648 (2009) 178.

- [490] M. Martínez-Parreño, J. Llorca-Pórcel, I. Valor, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3620.
- [491] S. Ozcan, A. Tor, M. E. Aydin, *Clean* 37 (2009) 811.
- [492] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J. L. Tadeo, *J. Sep. Sci.* 29 (2006) 2166.
- [493] P. Richter, M. Jiménez, R. Salazar, A. Maricán, *J. Chromatogr. A* 1132 (2006) 15.
- [494] V. Camel, *Analyst* 126 (2001) 1182.
- [495] M. Zougagh, M. Valcárcel, A. Ríos, *Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 399.
- [496] K. A. Abbas, A. Mohamed, A. S. Abdulamir, H. A. Abas, *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 4 (2008) 345.
- [497] D. García-Rodríguez, A. M. Carro-Díaz, R. A. Lorenzo-Ferreira, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1333.
- [498] C. Miège, J. Dugay, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 219.
- [499] J. M. Levy, L. A. Dolata, R. M. Ravey, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 349.
- [500] E. Moreno, J. Reza, A. Trejo, *Polycyclic Aromat. Compd.* 27 (2007) 239.
- [501] Md. Yeakub, A. Richard, B. Cole, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 923.
- [502] T. Sakamoto, A. Yamamoto, M. Owari, Y. Nihei, *Anal. Sci.* 20 (2004) 1379.
- [503] T. Cajthmal, V. Šašek, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 8448.
- [504] J. Hollender, J. Shneine, W. Dott, M. Heinzl, H. W. Hagemann, G. K. E. Götz, *J. Chromatogr. A* 776 (1997) 233.
- [505] G. Zhang, Z. Cui, J. Ling, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 31 (2008) 695.
- [506] V. Librando, O. Hutzinger, G. Tringali, M. Aresta, *Chemosphere* 54 (2004) 1189.
- [507] C. Lutermann, E. Willems, W. Dott, J. Hollender, *J. Chromatogr. A* 816 (1998) 201.
- [508] M. Letellier, H. Budzinski, *Analisis* 27 (1999) 259.
- [509] V. Camel, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 229.
- [510] C. Sparr Eskilsson, E. Björklund, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 227.
- [511] A. Zlotorzynski, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 25 (1995) 43.

- [512] J. M. R. Bélanger, J. R. Jocelyn Paré, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1049.
- [513] J. R. Dean, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 553.
- [514] V. López-Avila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho, R. Kim, W. F. Beckert, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2096.
- [515] Z. Zhang, G. Xiong, G. Lie, X. He, *Anal. Sci.* 16 (2000) 221.
- [516] V. López-Avila, R. Young, W. F. Beckert, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1097.
- [517] A. Pastor, E. Vázquez, R. Ciscar, M. De la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 344 (1997) 241.
- [518] V. Pino, J. H. Ayala, A. M. Afonso, V. González, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 515.
- [519] M. Gfrerer, E. Lankmayr, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1230.
- [520] G. Purcaro, S. Moret, L. S. Conte, *Meat Sci.* 81 (2009) 275.
- [521] V. O. E. Akpambang, G. Purcaro, L. Lajide, I. A. Amoo, L. S. Conte, S. Moret, *Food Addit. Contam. Part A* 26 (2009) 1096.
- [522] G. F. Hernández-Póveda, A. Morales-Rubio, A. Pastor-García, M. De la Guardia, *Food Addit. Contam. Part A* 25 (2008) 356.
- [523] M. Tomaniová, J. Hajslova, J. Pavelka, V. Kocourek, K. Holadova, I. Klimova, *J. Chromatogr. A* 827 (1998) 21.
- [524] N. Ratola, S. Lacorte, D. Barceló, A. Alves, *Talanta* 77 (2009) 1120.
- [525] V. Flotron, J. Houessou, A. Bosio, C. Delteil, A. Bermond, V. Camel, *J. Chromatogr. A* 999 (2003) 175.
- [526] P. Villar, M. Callejón, E. Alonso, J. C. Jiménez, A. Guiraúm, *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 295.
- [527] D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, B. H. G. Stoffelsen, E. Dijkman, C. J. Berkhoff, E. A. Hogendoorn, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 165.
- [528] L. Pensado, C. Casais, C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 505.
- [529] V. Fernández-González, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1207 (2008) 136.

- [530] O. Alvarez-Avilés, L. Cuadra-Rodríguez, F. González-Illán, J. Quiñones-González, O. Rosario, *Anal. Chim. Acta* 597 (2007) 273.
- [531] D. Castro, K. Slezakova, M. T. Oliva-Teles, C. Delerue-Matos, M. C. Alvim-Ferraz, S. Morais, M. C. Pereira, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 501.
- [532] S. Karthikeyan, R. Balasubramanian, S. W. See, *Talanta* 69 (2006) 79.
- [533] Y. Y. Shu, S. Y. Tey, D. K. S. Wu, *Anal. Chim. Acta* 495 (2003) 99.
- [534] K. K. Chee, M. K. Wong, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 259.
- [535] S. Bangkedphol, A. Sakultantimetha, H. E. Keenan, A. Songsasen, *J. Environ. Sci. Health Part A* 41 (2006) 1105.
- [536] L. Bartolomé, E. Cortazar, J. C. Raposo, A. Usobiaga, O. Zuloaga, N. Etxebarria, L. A. Fernández, *J. Chromatogr. A* 1068 (2005) 229.
- [537] N. Itoh, M. Numata, T. Yarita, *Anal. Chim. Acta* 615 (2008) 47.
- [538] N. Itoh, M. Numata, Y. Aoyagi, T. Yarita, *Anal. Chim. Acta* 612 (2008) 44.
- [539] S. Jayaraman, R. J. Pruell, R. Mckinney, *Chemosphere* 44 (2001) 181.
- [540] E. Vázquez-Blanco, P. López-Mahía, S. Muniategui-Lorenzo, D. Prada-Rodríguez, E. Fernández-Fernández, *Fresenius J. Anal. Chem.* 366 (2000) 283.
- [541] C. González-Piñuela, R. M. Alonso-Salces, A. Andrés, I. Ortiz, J. R. Viguri, *J. Chromatogr. A* 1129 (2006) 189.
- [542] H. Budzinski, M. Letellier, P. Garrigues, K. Le Menach, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 187.
- [543] K. K. Chee, M. K. Wong, H. K. Lee, *Environ. Monit. Assess.* 44 (1997) 587.
- [544] A. Criado, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 1050 (2004) 111.
- [545] E. R. Noordkamp, J. T. C. Grotenhuis, W. H. Rulkens, *Chemosphere* 35 (1997) 1907.
- [546] N. Saim, J. R. Dean, M. P. Abdullah, Z. Zakaria, *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 361.
- [547] Y. Y. Shu, T. L. Lai, H. Lin, T. C. Yang, C.-P. Chang, *Chemosphere* 52 (2003) 1667.

- [548] L. Xu, H. K. Lee, J. Chromatogr. A 1192 (2008) 203.
- [549] V. López-Avila, J. Benedicto, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 334.
- [550] B. E. Richter, B. A. Jones, J. L. Ezzell, N. L. Porter, Anal. Chem. 68 (1996) 1033.
- [551] H. Giergielewicz-Możajska, Ł. Dabrowski, J. Namieśnik, Crit. Rev. Anal. Chem. 31 (2001) 149.
- [552] R. Carabias-Martínez, E. Rodríguez-Gonzalo, P. Revilla-Ruiz, J. Hernández-Méndez, J. Chromatogr. A 1089 (2005) 1.
- [553] M. M. Schantz, J. J. Nichols, S. A. Wise, Anal. Chem. 69 (1997) 4210.
- [554] L. Ramos, E. M. Kristenson, U. A. Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 975 (2002) 3.
- [555] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6986.
- [556] A. Göbel, A. Thomsen, C. S. McArdell, A. C. Alder, W. Giger, N. Theiß, D. Löffler, T. A. Ternes, J. Chromatogr. A 1085 (2005) 179.
- [557] E. M. Golet, A. Strehler, A. C. Alder, W. Giger, Anal. Chem. 74 (2002) 5455.
- [558] M. Lillenberg, S. Yurchenko, K. Kipper, K. Herodes, V. Pihl, K. Sepp, R. Lõhmus, L. Nei, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 5949.
- [559] A. Nieto, F. Borrull, E. Pocurull, R. M. Marcé, J. Chromatogr. A 1213 (2008) 224.
- [560] M. M. Schantz, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 1043.
- [561] U. S. EPA, Method 3545 (SW-846), "Pressurized Liquid Extraction" (1998).
- [562] M. Jánková, M. Tomaniová, J. Hajšlová, V. Kocourek, Anal. Chim. Acta 520 (2004) 93.
- [563] L. Liguori, K. Heggstad, H. T. Hove, K. Julshamn, Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 181.
- [564] E. Trably, N. Delgènes, D. Patureau, J. P. Delgènes, Int. J. Environ. Anal. Chem. 84 (2004) 995.

- [565] V. Fernández-González, G. Grueiro-Noche, E. Concha-Graña, M. I. Turnes-Carou, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 174.
- [566] J. K. Houessou, C. Delteil, V. Camel, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 7413.
- [567] W. Jira, *Eur. Food Res. Technol.* 218 (2004) 208.
- [568] G. Wang, A. S. Lee, M. Lewis, B. Kamath, R. K. Archer, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1062.
- [569] R. C. Brändli, T. D. Bucheli, T. Kupper, F. X. Stadelmann, J. Tarradellas, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 86 (2006) 505.
- [570] K.-D. Wenzel, A. Hubert, M. Manz, L. Weissflog, W. Engewald, G. Schüürmann, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4827.
- [571] N. Alexandrou, M. Smith, R. Park, K. Lumb, K. Brice, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 81 (2001) 257.
- [572] M. A. Olivella, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 107.
- [573] H. Yagoh, H. Murayama, T. Suzuki, Y. Tominaga, N. Shibuya, Y. Masuda, *Anal. Sci.* 22 (2006) 583.
- [574] V. Yusá, G. Quintas, O. Pardo, A. Pastor, M. de la Guardia, *Talanta* 69 (2006) 807.
- [575] O. P. Heemken, N. Theobald, B. W. Wenclawiak, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2171.
- [576] V. Yusá, O. Pardo, P. Martí, A. Pastor, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 482.
- [577] N. Itoh, M. Numata, Y. Aoyagi, T. Yarita, *J. Chromatogr. A* 1138 (2007) 26.
- [578] J. G. Harb, J. H. Aldstadt, *Anal. Lett.* 37 (2004) 2835.
- [579] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 65.
- [580] S. Lundstedt, P. Haglund, L. Öberg, *Anal. Chem.* 78 (2006) 2993.
- [581] J. Hollender, B. Koch, C. Lutermann, W. Dott, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 83 (2003) 21.

- [582] L. Belkessam, P. Lecomte, V. Milon, A. Laboudigue, *Chemosphere* 58 (2005) 321.
- [583] J. D. Berset, M. Ejem, R. Holzer, P. Lischer, *Anal. Chim. Acta* 383 (1999) 263.
- [584] S. B. Hawthorne, C. B. Grabanski, E. Martin, D. J. Miller, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 421.
- [585] A. Hubert, K.-D. Wenzel, M. Manz, L. Weissflog, W. Engewald, G. Schüürmann, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1294.
- [586] A. Dreyer, M. Radke, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 423.
- [587] S. A. Barker, A. R. Long, C. R. Short, *J. Chromatogr.* 475 (1989) 353.
- [588] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 115.
- [589] S. A. Barker, *LC-GC Int.* 11 (1998) 719.
- [590] L. Maldaner, C. C. Santana, I. C. S. F. Jardim, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 31 (2008) 972.
- [591] Q.-H. Zou, Y. Liu, M.-X. Xie, J. Han, L. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 551 (2005) 184.
- [592] E. Chiacchierini, D. Restuccia, G. Vinci, *Talanta* 69 (2006) 548.
- [593] M. García, I. Rodríguez, R. Cela, *Anal. Chim. Acta* 590 (2007) 17.
- [594] X. Shen, J. Cai, Y. Gao, Q. Su, *Chromatographia* 64 (2006) 71.
- [595] E. Blanco, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *Anal. Chem* 78 (2006) 2772.
- [596] M. Ramil Criado, D. Hernanz Fernández, I. Rodríguez Pereiro, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1056 (2004) 187.
- [597] Y.-Y. Hu, P. Zheng, Y.-Z. He, G.-P. Sheng, *J. Chromatogr. A* 1098 (2005) 188.
- [598] K. Kishida, N. Furusawa, *J. Chromatogr. A* 937 (2001) 49.
- [599] N.J.K. Simpson, *Solid-phase extraction. Principles, techniques, and applications*, Marcel Dekker Inc., New York (2000).
- [600] E. M. Kristenson, L. Ramos, U. A Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 96.

- [601] M. García-López, P. Canosa, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 963.
- [602] S. Bogialli, A. Di Corcia, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 163.
- [603] S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 63.
- [604] Y. Picó, M. Fernández, M. J. Ruiz, G. Font, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 117.
- [605] M. D. Crouch, S. A. Barker, *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 287.
- [606] S. A. Barker, *J. Biochem. Biophys. Methods* 70 (2007) 151.
- [607] P. M. Loveland, A. P. Reddy, C. B. Pereira, J. A. Field, G. S. Bailey, *J. Chromatogr. A* 932 (2001) 33.
- [608] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J. L. Tadeo, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 576.
- [609] L. Pensado, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1077 (2005) 103.
- [610] P. Campíns-Falcó, J. Verdú-Andrés, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua, R. Herráez-Hernández, *J. Chromatogr. A* 1211 (2008) 13.
- [611] P. R. N. Fernandes, S. A. Soares, R. F. Nascimento, J. B. Soares, R. M. Cavalcante, *J. Chromatogr. Sci.* 47 (2009) 789.
- [612] K. Stanley, S. M. Simonich, D. Bradford, C. Davidson, N. Tallent-Halsell, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2038.
- [613] M. Zhao, F. van der Wielen, P. de Voogt, *J. Chromatogr. A* 837 (1999) 129.
- [614] P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675.
- [615] M. Fernández, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 43.
- [616] C. Crescenzi, S. Bayoudh, P. A. G. Cormack, T. Klein, K. Ensing, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2171.
- [617] Z.-Y. Li, Z.-C. Zhang, Q.-L. Zhou, R. Y. Gao, Q.-S. Wang, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 17.
- [618] S. Wang, Y. Xu, C. Pan, S. Jiang, F. Liu, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 673.

- [619] A. Sánchez Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, *Talanta* 71 (2007) 430.
- [620] T. Bajer, M. Adam, L. Galla, K. Ventura, *J. Sep. Sci.* 30 (2007) 122.
- [621] P. C. Abhilash, S. Jamil, N. Singh, *J. Chromatogr. A* 1176 (2007) 43.
- [622] C. Juan, J. C. Moltó, C. M. Lino, J. Mañes, *Food Chem.* 107 (2008) 525.
- [623] A. M. Carro, R. A. Lorenzo, F. Fernández, R. Rodil, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 93.
- [624] A. Martínez, M. Ramil, R. Montes, D. Hernanz, E. Rubí, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1072 (2005) 83.
- [625] Z. C. Kodba, D. B. Vončina, *Chromatographia* 66 (2007) 619.
- [626] V. I. Valsamaki, V. I. Boti, V. A. Sakkas, T. A. Albanis, *Anal. Chim. Acta* 573-574 (2006) 195.
- [627] C. Soler, J. Mañes, Y. Picó, *J. Chromatogr. A* 1048 (2004) 41.
- [628] A. I. Valenzuela, R. Lorenzini, M. J. Redondo, G. Font, *J. Chromatogr. A* 839 (1999) 101.
- [629] E. M. Kristenson, E. G. J. Haverkate, C. J. Stooten, L. Ramos, R. J. J. Vreuls, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 917 (2001) 277.
- [630] J. Cai, Y. Gao, X. Zhu, Q. Su, *Anal. Bioanal. Chem.* 383 (2005) 869.
- [631] U.S. EPA, Method 3630C "Silica gel cleanup" (1996), disponible en <http://www.epa.gov/>.
- [632] U.S. EPA, Method 3610B "Alumina cleanup" (1996), disponible en <http://www.epa.gov/>.
- [633] U.S. EPA, Method 3620C "Florisil cleanup" (1996), disponible en <http://www.epa.gov/>.
- [634] P. Oleszczuk, S. Baran, *J. Hazard. Mat. B* 113 (2004) 237.
- [635] H. Dąbrowska, Ł. Dąbrowski, M. Biziuk, J. Gaca, J. Namieśnik, *J. Chromatogr. A* 1003 (2003) 29.
- [636] S. Pérez, I. Ferrer, M.-C. Hennion, D. Barceló, *Anal. Chem.* 70 (1998) 4996.

- [637] U.S. EPA, Method 3640A "Gel permeation cleanup" (1994), disponible en <http://www.epa.gov/>
- [638] K. E. C. Smith, G. L. Northcott, K. C. Jones, *J. Chromatogr. A* 116 (2006) 20.
- [639] N. Ratola, A. Alves, N. Kalogerakis, E. Psillakis, *Anal. Chim. Acta* 618 (2008) 70.
- [640] V. R. Meyer, *Practical High-Performance Liquid Chromatography*, John Wiley & Sons, Chichester (1998).
- [641] S. Lindsay, *High Performance Liquid Chromatography, Analytical Chemistry by Open Learning*, John Wiley & Sons, New York (2002).
- [642] P. R. Brown, R. A. Harwick, *High Performance Liquid Chromatography*, Wiley Interscience, Michigan (1989).
- [643] J. G. Dorsey, W. T. Cooper, *Anal. Chem.* 70 (1998) 591R-644R.
- [644] D. A. Skoog, J. J. Leary, *Análisis Instrumental*, 4ª ed, McGraw-Hill, Madrid (1994).
- [645] D. W. Grant, *Capillary Gas Chromatography*, John Wiley, New York (1996).
- [646] H. M. McNair, J. M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons Inc., New York (1998).
- [647] R. Ohmacht, M. Kele, Z. Matus, *Chromatographia* 39 (1994) 668.
- [648] S. Kayillo, G. R. Dennis, R. A. Shalliker, *J. Chromatogr. A* 1126 (2006) 283.
- [649] J.-P. Lai, R. Niessner, D. Knopp, *Anal. Chim. Acta* 522 (2004) 137.
- [650] C. Baggiani, L. Anfossi, P. Baravalle, C. Giavannoli, G. Giraudi, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 413.
- [651] C. Ding, K. Qu, Y. Li, K. Hu, H. Liu, B. Ye, Y. Wu, S. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1170 (2007) 73.
- [652] R. Barbosa-Silva, C. R. Silva, C. Airoidi, C. H. Collins, I. C. S. F. Jardim, *Microchem. J.* 82 (2006) 150.
- [653] H. Ihara, W. Dong, T. Mimaki, M. Nishihara, T. Sakurai, M. Takafuji, S. Nagaoka, *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 26 (2003) 2491.

- [654] R. Gadzała-Kopciuch, M. Kluska, M. Wełniak, B. Buszewski, *Mat. Chem. Phys.* 89 (2005) 228.
- [655] B. H. Chen, C. Y. Wang, C. P. Chiu, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2244.
- [656] H. Wang, S. Yu, A. D. Campiglia, *Anal. Biochem.* 385 (2009) 249.
- [657] C. Bergvall, R. Westerholm, *Anal. Bioanal. Chem.* 384 (2006) 438.
- [658] Z.-Y. Gao, W.-S. Jiang, D. Sun, Y. Xie, Z.-L. Chen, L.-J. Yu, S.-Y. Xie, R.-B. Huang, L.-S. Zheng, *Talanta* 81 (2010) 48.
- [659] H. Moriwaki, M. Ishitake, S. Yoshikawa, H. Miyakoda, J.-F. Alary, *Anal. Sci.* 20 (2004) 375.
- [660] F. Sun, D. Littlejohn, M. D. Gibson, *Anal. Chim. Acta* 364 (1998) 1.
- [661] L. W. Lim, Y. Okouchi, T. Takeuchi, *Talanta* 72 (2007) 1600.
- [662] W. R. Trevelin, L. H. Vidal, M. D. Landgraf, I. C. E. Silva, M. O. O. Rezende, *Anal. Chim. Acta* 268 (1992) 67.
- [663] I. D. Brindle, X. F. Li, *J. Chromatogr. A* 498 (1990) 11.
- [664] R. D. De Veaux, M. Szelewski, *J. Chromatogr. Sci.* 27 (1989) 513.
- [665] W. Jennings, E. Mittlefehldt, P. Stremple, *Analytical gas chromatography*, 2^a ed, Academic Press, San Diego (1997).
- [666] J. de Boer, R. J. Law, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 223.
- [667] D. L. Poster, B. A. Jr Benner, M. M. Schantz, L. C. Sander, M. G. Vangel, S. A. Wise, *Polycycl. Aromat. Compd* 23 (2003) 113.
- [668] D. L. Poster, M. J. Lopez de Alda, M. M. Shantz, L. C. Sander, M. G. Vangel, S. A. Wise, *Polycycl. Aromat. Compd.* 23 (2003) 141.
- [669] D. L. Poster, J. R. Kucklick, M. J. Lopez de Alda, B. J. Porter, R. S. Pugh, M. M. Schantz, S. A. Wise, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1251.
- [670] S. A. Wise, D. L. Poster, M. M. Schantz, J. R. Kucklick, L. C. Sander, M. J. Lopez de Alda, P. Schubert, R. M. Parris, B. J. Porter, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1251.

- [671] D. L. Poster, L. C. Sander, S. A. Wise, In: O. Hutzinger, The handbook of environmental chemistry, vol 3 Part I, PAHs and related compounds, Springer, Berlin Heidelberg, New York (1998).
- [672] S. A. Wise, M. M. Schantz, B. A. Jr Benner, M. J. Hays, S. B. Schiller, Anal. Chem. 67 (1995) 1171.
- [673] L. C. Sander, M. Schneider, C. Woolley, S. A. Wise, J. Microcolumn. Sep. 6 (1994) 115.
- [674] K. P. Naikwadi, P. P. Wadgaonkar, J. Chromatogr. A 811 (1998) 97.
- [675] J. Staniewski, H. G. Janssen, C. A. Cramers, J. A. Rijks, J. Microcolumn Sep. 4 (1992) 331.
- [676] J. Teske, W. Engewald, Trends Anal. Chem. 21 (2002) 584.
- [677] W. Engewald, J. Teske, J. Efer, J. Chromatogr. A 856 (1999) 259.
- [678] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Talanta 74 (2008) 1096.
- [679] D. L. Poster, M. M. Schantz, L. C. Sander, S. A. Wise, Anal. Bioanal. Chem. 386 (2006) 859.
- [680] K. Riahi, N. Sellier, Chromatographia 47 (1998) 309.
- [681] S. Yurchenko, U. Mölder, J. Food Compos. Anal. 18 (2005) 857.
- [682] M. Niederer, Environ. Sci. Pollut. Res. 5 (1998) 209.
- [683] J. R. Kucklick, S. K. Sivertsen, M. Sanders, G. I. Scott, J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 213 (1997) 13.
- [684] S. M. Pyle, L. D. Betowski, A. B. Marcus, W. Winnik, R. D. Brittain, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 8 (1997) 183.
- [685] S. C. C. Lung, M. J. Wu, C. C. Lin, J. Expos. Anal. Environ. Epidemiol. 14 (2004) 529.
- [686] H. Bagheri, A. Mohammadi, J. Chromatogr. A 1015 (2003) 1015.
- [687] T. Hyötyläinen, A. Oikari, Sci. Total Environ. 244 (1999) 97.
- [688] A. Jaouen-Madoulet, A. Abarnou, A.-M. Le Guellec, V. Loizeau, F. Leboulenger, J. Chromatogr. A 886 (2000) 153.

- [689] C. J. Koester, A. Moulik, *Anal. Chem.* 77 (2005) 3737.
- [690] I. Ferrer, E. M. Thurman, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 750.
- [691] L. N. Williamson, M. G. Bartlett, *Biomed. Chromatogr.* 21 (2007) 664.
- [692] R. J. J. Vreuls, J. Dallüge, U. A. T. Brinkman, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 663.
- [693] G. Purcaro, P. Morrison, S. Moret, L. S. Conte, P. J. Marriott, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 284.
- [694] K. L. Liu, R. Heltsley, D. H. Zou, W. P. Pan, J. T. Riley, *Energy Fuel* 16 (2002) 330.
- [695] V. P. O'Malley, T. A. Abrajano, J. Hellou, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1996) 634.
- [696] V. P. O'Malley, T. A. Abrajano, J. Hellou, *Org. Geochem.* 21 (1994) 809.
- [697] C. McRae, C. G. Sun, C. F. McMillan, C. E. Snape, A. E. Fallick, *Polycycl. Aromat. Compd.* 20 (2000) 97.
- [698] A. Stark, T. Abrajano, J. Hellou, J. L. Metcalf-Smith, *Org. Geochem.* 34 (2003) 225.
- [699] M. Kim, M. C. I. Kennicutt, Y. Quian, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 6770.
- [700] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, *Nemrod® W*, ver. 2000, LPRAI, Marsell, Francia, 2000.
- [701] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 93.

CAPÍTULO III

EXPERIMENTAL

En este capítulo se incluyen los medios experimentales empleados para llevar a cabo los distintos trabajos de investigación recogidos en la presente memoria. De manera general, se describen los reactivos y el material utilizado, además de los protocolos de limpieza y acondicionamiento de ciertos materiales y reactivos. Se indica también de forma general la preparación de las disoluciones de trabajo, así como la recogida de las muestras y el modo en que se han realizado las adiciones de los analitos sobre las mismas.

Más adelante, en el **Capítulo IV** dedicado a la presentación y discusión de los resultados, se especifican para cada caso particular cuáles son los patrones, reactivos y materiales utilizados, así como el tratamiento de las muestras y las condiciones de análisis utilizadas.

1. PATRONES, DISOLVENTES Y REACTIVOS

1.1. PATRONES COMERCIALES

PATRONES INDIVIDUALES SÓLIDOS

Acenafteno [83-32-9], acenaftileno [208-96-8], antraceno [120-12-7], benzo[a]antraceno [56-55-3], benzo[a]pireno [50-32-8], benzo[b]fluoranteno [205-99-2], benzo[e]pireno [192-97-2], benzo[g,h,i]perileno [191-24-2], benzo[k]fluoranteno [207-08-9], criseno [218-01-9], dibenzo[a,h]antraceno [53-70-3], fluoranteno [206-44-0], fluoreno [86-73-7], indeno[1,2,3-c,d]pireno [193-39-5], naftaleno [91-20-3], fenantreno [85-01-8] y pireno [129-00-0] (Supelco). Todos los patrones sólidos presentan una pureza del 99%, excepto el benzo[e]pireno con una pureza del 98.5%.

PATRONES INDIVIDUALES EN DISOLUCIÓN

Dibenzo[a,l]pireno [191-30-0] (10 ng μL^{-1} en acetonitrilo) y 5-metilcriseno [3697-24-3] (10 ng μL^{-1} en acetonitrilo) (Dr Ehrenstorfer GmbH).

MEZCLA COMERCIAL DE PAHs en metanol-diclorometano (1:1, v/v), EPA 610 Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix (Supelco).

Tabla III.1. Concentraciones de PAHs en la mezcla comercial **EPA 610 MIX**

Compuesto	Pureza (%)	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Acenafteno	97.8	1001
Acenaftileno	97.4	1999
Antraceno	99.0	100.1
Benzo[a]antraceno	99.9	100.2
Benzo[a]pireno	99.8	100.1
Benzo[b]fluoranteno	99.9	200.2
Benzo[g,h,i]perileno	99.6	200.0
Benzo[k]fluoranteno	99.9	99.8
Criseno	99.9	100.1
Dibenzo[a,h]antraceno	98.5	200.0
Fluoranteno	96.9	200.0
Fluoreno	99.9	200.0
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	99.5	100.1
Naftaleno	99.9	1001
Fenantreno	98.8	100.2
Pireno	99.5	100.2

1.2. REACTIVOS, GASES Y DISOLVENTES

AGUA: Agua ultrapura (Milli-Q).

DISOLVENTES: Acetona, acetonitrilo, cloroformo, diclorometano, 2-propanol, metanol y n-hexano, todos ellos de grado gradiente HPLC o similar (Merck). Metanol y acetona, grado AnalR NORMAPUR (VWR) para lavado del material.

GASES: Nitrógeno 99.999% (generador de nitrógeno Nitrox Mini y Carburos Metálicos). Helio 99.999% y dióxido de carbono 99.999% (Carburos Metálicos).

ÁCIDOS Y BASES: Ácido clorhídrico 36% (Prolabo). Ácido nítrico 65% (Panreac). Hidróxido potásico en lentejas, +85% (Sigma-Aldrich).

LÍQUIDOS IÓNICOS: Hexafluorofosfato de 1-butil-3-metilimidazolio, +96% (Acros Organics). Hexafluorofosfato de 1-hexil-3-metilimidazolio, 99% y hexafluorofosfato de 1-octil-3-metilimidazolio, +98% (Sigma-Aldrich).

SALES: Cloruro sódico 99.7% (Prolabo). Sulfato sódico anhidro 99% (Panreac).

ADSORBENTES: C₁₈ (gel de sílice funcionalizada con grupos octadecilo) (malla 70-230, carga de carbono 9-12%), Florisil® (malla 60-100) y alúmina (óxido de aluminio) neutra (malla 150) (Sigma-Aldrich); Gel de sílice 60 (0.040-0.063 mm) (Merck).

VARIOS: Jabón Extran MA 03 exento de fosfatos (Merck). Arena (malla 50-70) (Sigma-Aldrich).

2. INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL

2.1. MATERIAL GENERAL

AGITACIÓN

Barritas agitadoras recubiertas de politetrafluoroetileno (PTFE) de dimensiones 8x3 mm (Sigma-Aldrich).

Vortex ZX3 (Velp Científica).

BALANZAS

Balanza analítica de precisión BP 211D, con 5 cifras decimales (Sartorius).

Granatario BP 310S, con 3 cifras decimales (Sartorius).

MATERIAL DE LABORATORIO

Material de vidrio de uso habitual en el laboratorio: vasos de precipitados, matraces aforados, probetas, pipetas, vidrios de reloj, embudos de decantación, etc.

Botellas de vidrio ámbar de 1 y 2.5 L con tapón de rosca y septum recubiertos de PTFE.

Cartuchos de SPE: Florisil Sep-Pak (900 mg), Silica Sep-Pak (500 mg), Oasis HLB 3cc (60 mg) y Oasis MAX 3cc (60 mg) (Waters).

Cartuchos Isolute SPE de polipropileno de 15 mL de capacidad, y fritas de polietileno de 20 µm (IST, International Sorbent Technology).

III. EXPERIMENTAL

Espátulas metálicas.

Papel de aluminio.

Papel indicador, pH 1-14 (Panreac).

Mano y mortero de porcelana de 70 mL vitrificado (Afora).

Mano y mortero de vidrio de 100 mm de diámetro (Afora).

Soportes, pinzas y nueces.

Termómetro de mercurio, con escala de 0 a 150 °C.

Tubos de vidrio (15 mL) de fondo cónico con tapones de rosca con septum recubiertos de PTFE (Afora).

MICROJERINGAS Y MICROPIPETAS

Microjeringa Hamilton de 100 µL de volumen (Supelco).

Pipetas automáticas fijas de 10, 20, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 µL, y variables de 20-200 µL, 100-1000 µL y 1-10 mL (Eppendorf, Brand, Kartell).

SISTEMA DE PURIFICACIÓN DE AGUA

Equipo de purificación de agua Milli-Q gradient A-10ZMQ S5V0T4 (Millipore).
Sistema de producción de agua ultrapura (destilador) (MultiPLY).

FILTRACIÓN

Equipo de filtración a vacío: Kitasato y placa de filtración.

Filtros de fibra de vidrio (diámetro 47 mm) de 0.7 µm (Millipore).

Filtros de jeringa (diámetro 13 mm) de difluoruro de polivinilideno (PVDF), Durapore Millex de 0.22 µm (GV) (Millipore).

Filtros de membrana (diámetro 47 mm) de 0.45 µm (HAWP) (Millipore).

Jeringas de polietileno de 2, 5 y 10 mL (Discardit II).

INSTRUMENTACIÓN GENERAL DE LABORATORIO

Baño de ultrasonidos 3000513 (P-Selecta).

Bomba de vacío Aspirator A-3S (Eyela).

Centrífuga Unicen (Orto-Alresa).

Placa calefactora (Selecta).

REFRIGERACIÓN Y SECADO

Congelador a una temperatura de -20 °C o inferior.

Nevera a una temperatura de +4 °C o inferior.

Desecador.

Estufa (100 °C o superior).

TRATAMIENTO DE MUESTRA SÓLIDA

Liofilizador Cryodos (Telstar). Tamizador de placas de distinta luz de malla (Retsch). Triturador (Moulinex).

SISTEMAS DE EXTRACCIÓN

Equipo de extracción con microondas Ethos E-320 (1000 W) (Milestone).

Sistema de extracción con disolventes presurizados ASE 200 (Dionex).

EQUIPOS DE CONCENTRACIÓN

Estación de concentración por corriente de nitrógeno Turbo-Vap II (Zymark).

Estación de concentración por corriente de nitrógeno Mini-Vap (seis vías) 22971 (Supelco).

Generador de nitrógeno Nitros, modelo mini 360.

VIALES

Viales de gases (1.7 mL) con cápsulas de aluminio y septa recubiertos de PTFE/silicona (Sugelabor).

Viales ámbar de rosca (4, 8, 16 mL) con tapones y septa recubiertos de PTFE (National Scientific).

Viales de espacio de cabeza (10, 22, 120 mL) con cápsulas de aluminio y septa recubiertos de PTFE/silicona (Sugelabor).

Encapsuladores y desencapsuladores, grandes y pequeños.

2.2. INSTRUMENTACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN

SISTEMAS DE DETERMINACIÓN

HPLC-UV-Flu

Sistema de almacenamiento y dispensación de la fase móvil, constituido por botellas de vidrio de 1L de capacidad cubiertas con tapones de polietileno. Mecanismo de desgasificación en línea basado en la incorporación de Helio a los disolventes a un flujo de 100 mL min⁻¹. Bomba cuaternaria Waters, modelo 600E, con programador de gradientes en el que cabe la posibilidad de seleccionar 11 curvas distintas, además de permitir trabajar en régimen isocrático de elución. Inyector automático, modelo 700 Satellite WISP (Waters) e inyector manual Rheodyne, modelo 7725i, con un bucle externo de 20 µL. Horno termostatzado MetaChem, modelo MetaTherm 2075. Detector de diodos en serie (DAD), HP 1100 (Agilent). Detector de fluorescencia de señal múltiple, escaneado rápido en línea y con capacidad de análisis de los datos espectrales, Serie 1100 (Agilent).

Precolumnas: Precolumna Vydac 201 TP Fase Invertida C₁₈, de dimensiones 30 mm x 2 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm (Agilent). Precolumna Waters Guard-Pak, Insert Nova-Pak C₁₈, con tamaño de partícula de 4 µm (Waters).

Columnas: Columna cromatográfica Vydac 201 TP52 Fase Invertida C₁₈, de dimensiones 250 mm x 2 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm (Agilent). Columna cromatográfica Waters PAH C₁₈, de dimensiones 250 x 4.6 mm de diámetro interno, con un diámetro de partícula de 5 µm (Waters).

GC-MS

Cromatógrafo de gases Varian 450, equipado con inyector de vaporización con temperatura programable PTV 1079 e inyector automático CP-8400 (Varian), y acoplado a un espectrómetro de masas con trampa de iones Varian 240. **Columna** capilar tipo J&W HP-5MS (30 m x 0.25 mm I.D., 0.25 μm de espesor de fase).

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Software de procesamiento de datos **Agilent Chemstation** (Rev. A. 06.03 [509] (Agilent)).

Paquete de estadística gráfica **Statgraphics V 5.1**

Software de diseño de experimentos **NemrodW V-2000D** [700]

Software **Varian MS Workstation v6.9.1**.

3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

3.1. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES ESTÁNDAR DE ANALITOS

Las disoluciones estándar individuales de los PAHs estudiados se prepararon por pesada en balanza analítica, a partir de los correspondientes patrones comerciales individuales. Las concentraciones oscilaron entre 200 y 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y los disolventes utilizados (acetona, acetonitrilo, diclorometano y metanol) se eligieron en función de la solubilidad de los analitos y de la técnica de determinación utilizada en cada caso.

A partir de las disoluciones estándar individuales se prepararon disoluciones individuales intermedias (100 ng mL^{-1}) en acetonitrilo y n-hexano, que se utilizaron para determinar el tiempo de retención de los analitos en HPLC-UV-Flu y en GC-MS, respectivamente. Por otro lado, las disoluciones estándar se utilizaron para preparar mezclas de los PAHs a diferentes concentraciones, que se utilizaron posteriormente para realizar adiciones sobre las muestras estudiadas. En todos los casos, las disoluciones estándar empleadas para la contaminación de las muestras se prepararon por dilución en acetonitrilo.

Por otro lado, a partir de la mezcla comercial de PAHs (EPA 610 PAHs MIX, **tabla III.1**), las disoluciones comerciales de 5-metilcriseno y dibenzo[a,l]pireno, y la disolución stock de benzo[e]pireno, se prepara una mezcla de PAHs a concentraciones entre 100 y 2000 ng mL⁻¹, en acetonitrilo (HPLC) o en n-hexano (GC-MS). Esta mezcla será la disolución de partida para preparar los niveles de calibración. Así, las disoluciones patrón utilizadas para construir las rectas de calibrado de cada uno de los PAHs en estudio, se preparan por dilución, en acetonitrilo-agua (1:1, v/v) o en n-hexano, a partir de la disolución mezcla inicial.

3.2. OTRAS DISOLUCIONES

DISOLUCIÓN SATURADA DE HIDRÓXIDO POTÁSICO EN METANOL

La disolución saturada de hidróxido de potasio en metanol, utilizada en todos los procedimientos de preparación de muestra sólida incluidos en esta memoria, se prepara pesando 50 g de hidróxido potásico, y disolviéndolos con ayuda de un baño de ultrasonidos, en 100 mL de metanol. Esta disolución se guarda en un recipiente de vidrio ámbar a temperatura ambiente, y se deja reposar durante al menos 12 horas, para asegurar que todo el sólido que permanece en disolución se deposite en el fondo del recipiente.

MEZCLA LÍQUIDO IÓNICO-DISOLVENTE DISPERSANTE

Los líquidos iónicos utilizados en el método desarrollado para la determinación de PAHs en aguas, son altamente viscosos, lo que dificulta su medida utilizando jeringas o micropipetas convencionales. Para solucionar este problema y obtener experimentos reproducibles, la mezcla IL-disolvente dispersante se prepara de antemano mediante pesada en balanza analítica. Teniendo en cuenta el porcentaje de pureza y la densidad, se pesa la cantidad correspondiente de IL y posteriormente se añade la cantidad necesaria de disolvente dispersante. La mezcla se agita durante unos minutos en el vórtex y se conserva a temperatura ambiente.

3.3. FASES MÓVILES PARA HPLC

Acetonitrilo y agua fueron los disolventes utilizados como fases móviles para HPLC en todos los trabajos de investigación desarrollados. Para minimizar problemas de interferencias se utilizaron disolventes de alta pureza y las fases móviles se renovaron asiduamente para evitar su deterioro. Los disolventes utilizados en la composición de las fases móviles se prepararon siempre de modo individual, dado que la bomba cromatográfica utilizada posee una válvula de mezcla. No fue necesario la desgasificación previa de los disolventes puesto que el equipo utilizado incluye un sistema de desgasificación mediante burbujeo de Helio.

3.4. CONSERVACIÓN DE DISOLUCIONES

La mezcla comercial de PAHs y las disoluciones concentradas de los distintos compuestos utilizados a lo largo de la parte experimental, se conservaron a -18 °C, mientras que el resto de las disoluciones intermedias al igual que las de trabajo se conservaron en nevera a 4 °C en viales de color ámbar.

4. MUESTRAS ESTUDIADAS

4.1. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Durante el periodo de investigación realizado en los últimos años, se han estudiado muestras medioambientales y biológicas de diferente complejidad. Se establece una clara diferenciación entre muestras líquidas, donde se analizaron muestras de aguas de diferente procedencia, y muestras sólidas, donde se incluyen muestras de suelos, lodos de depuradora y material biológico.

A pesar de que el agua está considerada como una de las matrices medioambientales más sencilla, es importante destacar que no todas presentan el mismo grado de complejidad. El contenido de materia orgánica y el nivel de contaminación de cada muestra de agua, influye de manera importante en su análisis, dificultándolo en mayor o menor medida. En base a estas premisas y con el objetivo de desarrollar un método adecuado para el análisis de todo tipo de aguas, se han analizado muestras de agua de grifo, botella, fuente, pozo, lluvia, río y aguas residuales (influyente y efluente) procedentes de una planta depuradora.

III. EXPERIMENTAL

Para la recogida y almacenamiento de las muestras de agua, se utilizaron botellas de vidrio ámbar de 1 L con tapón de rosca recubierto de teflón. En el interior de cada botella se añadió un 10% de 2-propanol para evitar la adsorción de los PAHs a las paredes del recipiente.

Las muestras de agua de grifo se tomaron en el laboratorio después de dejar fluir el agua durante unos minutos. El agua embotellada se adquirió en un supermercado local del área de Santiago de Compostela. Las muestras de agua de pozo y fuente se recogieron en una zona costera (Louro, A Coruña). El agua de lluvia se recogió en un núcleo urbano (Bertamiráns, A Coruña), durante un periodo especialmente lluvioso. Las muestras de agua de río analizadas se tomaron en diversas localizaciones de Galicia, concentradamente en el río Dos Pasos (Bertamiráns, A Coruña) y en el río Ulla (Pontecesures, Pontevedra), en puntos de muestreo próximos a la zona urbana. Las muestras de agua residual, tanto de entrada (influyente) como de salida (efluente), proceden de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) cercana a Santiago de Compostela, que reciben principalmente descargas domésticas urbanas y hospitalarias.

Para eliminar los posibles sólidos en suspensión de las muestras, se realiza una filtración a vacío, utilizando filtros de membrana de 0.45 μm de tamaño de poro. En algunos casos, como en agua de río o agua residual, que contienen una mayor cantidad de materia particulada, es necesaria una filtración a vacío previa a través de filtros de fibra de vidrio (0.7 μm).

Las muestras de pescado (rodaballo, salmón, lamprea y merluza) proceden de distintos supermercados de Santiago de Compostela. En todos los casos, antes de realizar la adición sobre las muestras, se extrae el músculo de pescado y se tritura para obtener una mejor homogenización. Posteriormente una porción de tejido fresco se contamina con los analitos estudiados, mientras otra porción se conserva como blanco de muestra. Las muestras se conservan en el congelador a -18°C durante al menos 24 h. Tras su congelación, las muestras se introducen en el liofilizador para eliminar el agua por desecación a vacío y a bajas temperaturas (sublimación), durante un periodo mínimo de una semana, hasta que haya tenido lugar la completa liofilización de los mismos. Finalmente, las muestras liofilizadas se guardan en frascos de vidrio de color ámbar con tapón de rosca.

La muestra de suelo agrícola contaminada se recogió en una región (Louro, A Coruña) seriamente afectada por incendios forestales durante el año 2006 y años anteriores. La muestra se liofilizó para eliminar el contenido en humedad. A continuación, se tamizó a través de diferentes tamaños de malla (1000-300 μm , 300-60 μm , < 60 μm) y las distintas fracciones se almacenaron por separado en frascos de vidrio de color ámbar, antes de su análisis.

Las muestras de lodo de depuradora de aguas residuales proceden de diferentes zonas de Galicia. Se recibieron en el laboratorio en recipientes de plástico de 1 L de capacidad. A su llegada se separaron en porciones menores (250 mg) y se conservaron en el congelador (-18 °C) durante al menos 24 horas. Tras su congelación, estos lodos se liofilizaron para eliminar el agua. A continuación, se homogenizaron utilizando un mortero de porcelana y se guardaron en frascos de vidrio en ausencia de luz.

El pool de lodos utilizado para la optimización de uno de los métodos propuestos, se prepara pesando las cantidades oportunas de cuatro muestras de lodo de diferente procedencia. La mezcla de lodos se homogeniza utilizando un mortero de porcelana y posteriormente se guarda en un frasco de vidrio de color ámbar.

4.2. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD Y DEL CONTENIDO GRASO DE LAS MUESTRAS. ANÁLISIS ELEMENTAL

La determinación del contenido graso de las muestras utilizadas en este trabajo se lleva a cabo utilizando el método de Bligh & Dyer [701]. Se introducen 0.5 g de muestra liofilizada (2.5 g muestra fresca) en un embudo de decantación y se añaden 10 mL de metanol y 5 mL de cloroformo. Se agita durante unos minutos y se añaden 5 mL más de cloroformo antes de continuar agitando. A continuación, se añaden 9 mL de agua Milli-Q y se agita nuevamente, observándose la separación de dos fases. La grasa permanece en la fase orgánica (fase inferior). La fase acuosa se reextrae con 10 mL de una mezcla de metanol-cloroformo (1:9, v/v) agitando durante tres minutos. Se recoge nuevamente la fase inferior (orgánica), que se junta con la anterior, y la fase acuosa se desecha. La fase orgánica se centrifuga para comprobar que no quede ningún resto acuosos o algún sólido. El total de fase orgánica se concentra hasta 0.5 mL bajo corriente de nitrógeno en la estación

concentradora Turbo Vap, con una presión de nitrógeno de 11-12 psi y una temperatura del baño de 25 °C. Los 0.5 mL se pasan a un vial pesado previamente y se concentra a sequedad bajo corriente de nitrógeno en el Mini-vap. El porcentaje graso de la muestra se determina por diferencia de pesada.

El porcentaje de agua de las distintas muestras sólidas estudiadas, se determinó gravimétricamente, con el fin de poder calcular las concentraciones de PAHs en los materiales referidas a peso seco.

Asimismo, se solicitó el análisis elemental de las muestras a la Unidad de Análisis Elemental de la Red de Infraestructura de Apoyo a la investigación y al Desarrollo Tecnológico (RIAIDT) de la Universidad de Santiago de Compostela, para tener una mayor información de la composición de las muestras analizadas.

4.3. CONTAMINACIÓN DE LAS MUESTRAS

La optimización de los diferentes métodos recogidos en esta memoria, se ha llevado a cabo utilizando muestras con adición de PAHs. En el caso de las muestras acuosas, se mide el volumen de muestra necesario y se adiciona una pequeña cantidad del patrón mezcla de PAHs en isopropanol. Una vez cerrado el vial, se agita durante unos minutos para favorecer la homogenización y finalmente se dejan reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

Con respecto a las muestras sólidas, se pesó la cantidad necesaria de cada muestra y se añadió un volumen adecuado de un patrón mezcla de PAHs, de manera que toda la muestra quedara bien empapada. Esta mezcla se dejó secar durante varios días a temperatura ambiente, removiéndola ocasionalmente con varilla de vidrio. Las adiciones se realizaron varios meses antes de su análisis, para garantizar la interacción analito-matriz, intentando simular una muestra real contaminada.

4.4. MATERIALES DE REFERENCIA

Lodo **BCR088** (IRMM, Institute for Reference Materials and Measurements).

Lodo **RTC-CNS312-04** (LGC Standards).

Suelo industrial contaminado **BCR 524** (IRMM).

Tejido de mejillón **SRM 2977** (NIST, National Institute of Standards & Technology).

4.5. CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

Generalmente las muestras de agua se procesan inmediatamente después de su recogida y preparación. Si esto no fuese posible, se conservan en nevera a 4 °C en ausencia de luz por un periodo máximo de una semana.

Respecto a las muestras sólidas, las muestras frescas (sin liofilizar), tales como pescados y lodos de depuradora, se conservaron en el congelador a -18 °C. Las muestras liofilizadas con adición y los materiales de referencia se conservaron en nevera a 4 °C, para garantizar su estabilidad, mientras que las muestras liofilizadas sin adición, se conservaron a temperatura ambiente.

4.6. DETERMINACIÓN DEL RESIDUO SECO

El residuo seco proporciona información acerca de la limpieza de los extractos, y ha sido un parámetro tenido en cuenta, a la hora de optimizar las distintas metodologías. Su determinación se lleva a cabo introduciendo 1.5 mL de extracto, obtenido tras la etapa de extracción de la muestra, en un vial pesado previamente. Se concentra a sequedad bajo corriente de nitrógeno en el Mini-vap y el residuo se calcula por diferencia de pesada.

5. ACONDICIONAMIENTO Y LIMPIEZA DEL MATERIAL

5.1. ACONDICIONAMIENTO DE ADSORBENTES

La sílice y el Florisil[®], utilizados en MSPD y PLE, presentaban trazas de PAHs, dando lugar a problemas con los blancos de reactivos. Para solventar este problema, estos materiales (5 g aprox.) se lavaron en columna con 20 mL de hexano-acetona (1:1, v/v). Los adsorbentes se secaron y se conservaron en un desecador hasta su uso.

Por otro lado, en algunos de los experimentos realizados, los materiales de fase normal (sílice y Florisil®) se utilizaron activados. Para ello, se mantuvieron en la estufa a 105 °C durante 48 h y posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente en el interior de un desecador, conservándose en recipientes cerrados hasta el momento de su uso.

5.2. LAVADO DEL MATERIAL

Debido a que los PAHs son compuestos muy hidrofóbicos presenta una gran tendencia a quedarse adsorbidos en el material empleado, provocando con ello problemas de memoria. El lavado del material resultó ser un aspecto clave a la hora de obtener blancos reproducibles y por lo tanto fue preciso llevar a cabo un protocolo de limpieza del material reutilizable. El protocolo consistió en sucesivos lavados con agua de grifo y con jabón libre de fosfatos. A continuación, el material se enjuagó varias veces con agua de grifo, agua Milli-Q y acetona; y finalmente se llevó a cabo un lavado con diclorometano. El material de vidrio no volumétrico se secó en estufa a 100 °C.

Este protocolo de limpieza se sigue también para el lavado de botellas y recipientes empleados para la toma de muestras.

En algunos casos, el material necesita etapas de limpieza adicionales, que generalmente consisten en lavados en baño de ultrasonidos con diferentes disolventes. La microjeringa utilizada en DLLME se sometió a dos lavados sucesivos de 15 min, en baño de ultrasonidos utilizando metanol en la primera etapa y una mezcla de diclorometano-metanol (1:1, v/v) en el segundo lavado.

Los cartuchos y las fritas utilizadas en MSPD originaron problemas de blancos, por lo que fue necesario realizar un lavado previo a su uso, que consistió en baño de ultrasonidos durante 15 minutos, con acetona, y a continuación otros 15 minutos con una mezcla de hexano-acetona (1:1, v/v). El material se secó a temperatura ambiente y se guardó en bolsas limpias.

Las diferentes partes que componen la celda de extracción de PLE, se lavaron durante 15 minutos en baño de ultrasonidos con una mezcla de hexano-acetona (1:1, v/v), con el fin de obtener blancos reproducibles.

Finalmente, es importante mencionar que cada cierto tiempo, los vasos de microondas se someten a un lavado ácido. Durante la extracción asistida por microondas, restos de muestra sólida pueden adsorberse a las paredes de los vasos de extracción, produciendo problemas de contaminación con el paso del tiempo. Según las especificaciones del manual de Milestone, la mejor manera para solucionar estos problemas, es realizar una extracción ácida, en condiciones similares a las utilizadas para la extracción de las muestras. Así, la etapa de limpieza consistió en una extracción a 150 °C durante 25 minutos, utilizando una mezcla de ácido nítrico y agua en proporción 1:1 (v/v). Una vez realizada la extracción los vasos se sometieron nuevamente al protocolo general de lavado del material, para eliminar los restos de ácido.

6. GESTIÓN DE RESIDUOS

Los residuos generados durante el proceso experimental se dividieron en dos categorías, sólidos y líquidos. Los residuos sólidos, entre los que se encuentra todo el material desechable, se clasificaron a su vez como residuos plásticos (puntas de micropipeta, tapas de viales, cartuchos, jeringas de plástico, filtros, etc.) y residuos de vidrio (pipetas Pasteur, viales, envases de vidrio, etc.), y se almacenaron por separado en contenedores de 100 L. En cuanto a los residuos líquidos, se dividieron en acuosos y orgánicos, almacenándose por separado en bidones de 25 L. Además, los residuos de disolventes orgánicos se separaron en dos categorías, clorados y no clorados, cada uno en contenedores de 25 L.

En cuanto a los residuos de fase móvil, se recogieron en bidones de 25 L situados al final de la línea del sistema cromatográfico y se etiquetaron como disoluciones acuosas de contaminantes orgánicos. Si bien es cierto que los residuos de fase móvil se componen mayoritariamente de una mezcla de acetonitrilo y agua, no hay que pasar por alto que también contienen PAHs, por lo que estos residuos deben ser etiquetados adecuadamente.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este **Capítulo IV** se presentan los resultados obtenidos durante la etapa de investigación de esta Tesis Doctoral. Con el objetivo de facilitar la comprensión de los resultados, se ha establecido una clara diferenciación en base al tipo de matriz estudiada en cada momento. Por un lado se presenta el desarrollo de procedimientos de preparación muestra para la determinación de PAHs en muestras sólidas (**Capítulo IV.1**), tales como material biológico, lodos de depuradora de aguas residuales y suelos y, por otro, el desarrollo de un método de determinación de PAHs en muestras acuosas (**Capítulo IV. 2**).

Las técnicas de extracción se eligieron en base a la naturaleza y complejidad de las muestras, intentando en la medida de lo posible, el desarrollo de métodos analíticos rápidos y simples, con bajo consumo de disolventes. Así, se eligió una técnica de microextracción (**DLLME**) para llevar a cabo la extracción y concentración de los PAHs de muestras de agua, mientras que se optó por técnicas de extracción modernas (**MAE**, **MSPD** y **PLE**) para la extracción de los analitos de muestras sólidas.

HPLC con detección de fluorescencia fue la técnica empleada para la determinación de los PAHs en la mayoría de los casos, haciendo uso de **GC-MS/MS** en alguna ocasión, para la confirmación y validación de los resultados.

1. DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS SÓLIDAS

En este **Capítulo IV.1**, se recogen los métodos desarrollados para la determinación de PAHs en muestras sólidas. Se han estudiado muestras sólidas de diferente naturaleza y complejidad, como son pescados, lodos de depuradora de aguas residuales y suelos.

La elevada complejidad de las matrices medioambientales y biológicas, y la fuerte tendencia de los PAHs a adsorberse a las partículas sólidas y al material lipídico presente en las muestras, dificultan enormemente la determinación de estos contaminantes en este tipo de matrices. La determinación de PAHs en muestras sólidas es, a menudo, un proceso lento y laborioso. Generalmente, los métodos de análisis, incluyen una etapa de extracción mediante una técnica eficiente, y una o varias etapas de purificación, debido fundamentalmente, a que en las condiciones utilizadas para la extracción de los PAHs, suelen extraerse cantidades importantes de sustancias interferentes.

En este trabajo, se ha tratado de desarrollar metodología analítica para la determinación de PAHs en pescados, suelos y lodos de depuradora, prestando especial atención en aspectos como la simplicidad y rapidez, la reducción del volumen de disolvente utilizado, y la aplicabilidad de los métodos. Lo que se persigue es que la metodología propuesta sea de utilidad en laboratorios donde se lleva a cabo el control rutinario de estos contaminantes en distintas matrices ambientales.

Las técnicas utilizadas para la extracción de los PAHs de las diferentes matrices estudiadas, han sido MAE, MSPD y PLE. Se trata de técnicas modernas y rápidas, que implican un menor volumen de disolvente.

La separación y determinación de los analitos se llevó a cabo mediante HPLC-Flu. En el caso de las muestras de lodo, además de utilizar HPLC-Flu, se ha optimizado un método de GC-MS/MS basado en la inyección de grandes volúmenes, con fines de confirmación y validación.

1.1. DETERMINACIÓN DE PAHs EN MATERIAL BIOLÓGICO

1.1.1. INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del estudio desarrollado en este capítulo, es la optimización de metodología analítica para la determinación de PAHs en muestras de pescado.

La determinación de PAHs en muestras biológicas se complica en gran medida por la presencia de lípidos. Tanto los PAHs como los lípidos presentan carácter apolar, siendo extraídos normalmente en la misma fracción. La presencia de lípidos en los extractos origina a menudo deterioro en los sistemas de separación y detección empleados, causando daños irreversibles en las columnas cromatográficas. Debido a los altos niveles de lípidos que contienen normalmente las muestras de origen animal, es necesario encontrar métodos para la destrucción de los mismos, con el fin de obtener extractos limpios que no afecten al sistema cromatográfico.

En este trabajo se utiliza la saponificación asistida por microondas, con una disolución metanólica de hidróxido potásico. En primer lugar, se lleva a cabo la determinación de la grasa de distintas muestras de pescado, aplicando el método de Bligh & Dyer. El objetivo es conocer el porcentaje de grasa de varios tipos de muestras (rodaballo, salmón, lamprea y mejillón) y relacionarlo con la cantidad de potasa metanólica necesaria, para llevar a cabo la hidrólisis lipídica, con ayuda de energía de microondas.

Una vez conocidos estos datos, se elige una muestra con bajo contenido graso (rodaballo) y una con alto contenido graso (salmón), para optimizar el método analítico. La extracción de los compuestos a partir de las muestras de pescado y la saponificación de los lípidos se lleva a cabo simultáneamente, utilizando extracción asistida por microondas (**MAE**). La optimización de las condiciones de extracción, se lleva a cabo mediante **diseños experimentales**.

La purificación de los extractos obtenidos en la extracción asistida por microondas es también una etapa importante dentro del proceso analítico. En este caso se eligió una etapa de limpieza basada en **SPE**, para la cual se probaron cartuchos de sílice y Florisil.

Como técnica analítica se ha elegido la **cromatografía líquida de alta resolución con detector de fluorescencia**.

Los resultados obtenidos se resumen en la publicación que se incluye a continuación.

1.1.2. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA POR MICROONDAS PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN MUESTRAS DE PESCADO

Publicación I. "Optimization of a microwave-assisted extraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from fish samples", *J. Chromatogr. A* 1121 (2006) 163 (Pág. 175).

**1.1.2. OPTIMIZACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN ASISTIDA
POR MICROONDAS PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN MUESTRAS DE
PESCADO**

Publicación I

**OPTIMIZATION OF A MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION METHOD
FOR THE ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS
FROM FISH SAMPLES**

J. Chromatogr. A 1121 (2006) 163

Doi:10.1016/j.chroma.2006.04.038

OPTIMIZATION OF A MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION METHOD FOR THE ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS FROM FISH SAMPLES

T. Pena^a, L. Pensado^a, C. Casais^a, C. Mejuto^a, R. Phan-Tan-Luu^b, R. Cela^a

^a Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

^b Laboratoire de Méthodologie de la Recherche Experimentale, Centre St. Jérôme, 13397 Marseille Cedex 20, France

Abstract

A microwave-assisted extraction (MAE) procedure has been developed and optimized for the extraction of six regulated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from muscle samples of polluted fish. The procedure involves the simultaneous microwave-assisted extraction of PAHs with n-hexane and the lipids hydrolysis with potassium hydroxide. Experimental design methodology allows a quick and robust optimization of operational parameters such as the extraction time, temperature and solvent volumes. In these final optimized conditions, the procedure can be applied to a vast range of fat containing fish samples without significant changes, thus enabling its routine use. Recoveries around 90% for the studied compounds benz[a]anthracene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, and indeno[1,2,3-cd]pyrene and quantification limits (between 0.07 and 0.53 ng/g dry weight) far below the regulated limits, have been obtained. The procedure is applied to several different fish samples. Further, accuracy validation using NIST SRM 2977 reference material was carried out.

Keywords: Polyaromatic hydrocarbons; Microwave-assisted extraction; Fish tissue analysis

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons are widespread environmental pollutants having both natural (forest fires and volcanic activity) [1] and anthropogenic origin (incomplete combustion of fossil fuels, coke production, many industrial processes, and so on) [2,3].

Adverse effects of PAHs on living organisms have been studied for decades. Some of them have been classified as carcinogenic and mutagenic [4] and 16 PAHs were listed as priority pollutants by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) [5,6].

Major routes of exposure to PAHs are from inhaled air and especially by the ingestion of contaminated food [7]. PAHs in the atmosphere enter into the aquatic environment being readily taken up and bioaccumulated by aquatic organisms [8]. Because of hydrophobicity of PAHs, marine sediments concentrate the pollutants, especially in coastal waters where fish and molluscs are particularly prone to exposure and accumulation. Oil spills and run-off from land or industrial effluents [9] or the use of creosote-treated wood in mussel aquaculture [10] is an important cause of PAHs pollution in coastal waters. In general, fish have a greater ability to metabolize PAHs than do molluscs, so the compounds tend to persist more in the latter [8]. The ability of fish to metabolize PAHs probably explains why benzo[a]pyrene sometimes is not detected or is found only at very low concentrations in fish from heavily contaminated areas [11,12].

Recently, the European Union established maximum levels for benzo[a]pyrene (2 ng/g wet weight) in muscle meat of fish [13]. Previously, after the Prestige accident, the Spanish government established regulatory levels affecting six PAHs in fish and shellfish tissues [14], on the basis of the same levels established by the French government 3 years before on the occasion of the Erika accident [15]. These levels (on dry weight basis) were 20 ng/g for benz[a]anthracene (B[a]A), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[a]pyrene (B[a]P), dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A), and indeno[1,2,3-cd]pyrene (I[1,2,3-cd]P) in fish samples and 200 ng/g for crustaceans, cephalopods, and molluscs. Although it is common to control the 16 PAHs in US-EPA list to evaluate pollution by the more frequently found PAHs in the

environment, those six PAHs were selected on the basis of their potential toxicity regarding human diet.

From the analytical point of view, isolation of fat-soluble analytes, such as PAHs from biological matrices, most often involves the hydrolysis of lipids before the extraction of analytes. Also, more or less complicated clean up procedures need to be applied after extraction to provide extracts ready for the accurate analytical determination [16]. A large number of papers have been published on PAHs extraction from fish material using Soxhlet based procedures [17-19], pressurized liquid extraction (PLE; Dionex trade name ASE for accelerated solvent extraction) [20], supercritical fluid extraction (SFE) [21], and matrix solid-phase dispersion (MSPD) [22]. Other techniques, such as microwave-assisted extraction (MAE), have been used mainly for wood [23], sediment [24] and sludge [25] samples. To our knowledge, MAE has not been reported for the simultaneous extraction of PAHs and hydrolysis of sample lipids.

The aim of the present work was to develop and evaluate a MAE procedure for the extraction of the above mentioned six regulated PAHs from fish samples. Alkaline digestion stage needed to process fatty samples is carried out concomitantly with the extraction itself. To optimize the operational parameters experimental design methodology was applied. In this way a robust procedure was developed that allow processing of any kind of fish sample no matter what the fat content is. Two types of fish samples representatives from low and high fat content fish (turbot and salmon) were considered for experimental optimization. Other samples of low and high fat content (mussel and lamprey) were also analyzed to verify the applicability of the developed procedure. Accuracy validation was carried out using US National Institute of Standards and Technology (NIST) SRM 2977 mussel tissue reference material. All extracts were analyzed by HPLC using fluorescence detection.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Apparatus and reagents

Sample extractions were performed using an Ethos E-320 (1000 W) Microwave Extraction System (Milestone, Leutleirch, Germany) equipped with 12

vessels with a nominal volume of 100 mL. Maximum values for temperature and pressure inside of extraction vessels are 260 °C and 35 bar (500 psi), respectively.

Chromatographic separations were developed in a system composed by a 600E pump, with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA), UV-vis diode array and fluorescence detectors in series (HP Series 1100, Agilent, Waldbrom, Germany). The injector was a Rheodyne Model 7725i (Cotati, CA, USA), fitted with a 20 µL external loop. The temperature precolumn and analytical column was controlled by the means of a MetaTherm 9540 oven, supplied by MetaChem (Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 2.1 mm I.D. Vydac 201TP52 column, with particle size of 5 µm. A 30mm x 2mm guard column Vydac 201TP was employed to protect the analytical column, both purchased from Agilent.

Data acquisition was carried out by the means of Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]). Statistical treatments and manipulation were carried out by the means of the Statgraphics V 5.1 statistical package (Statistical Graphics Corp., Rockville, MD, USA) and Nemrod WV 2000D experiment designer software (LPRAI, Marseille, France).

Sample extracts were centrifuged with a Unicen centrifuge (Orto-Alresa, Madrid, Spain), concentrated with a Turbo Vap II nitrogen evaporator supplied by Zymark (Hopkinton, MA, USA).

Acetonitrile and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), n-hexane, chloroform and dichloromethane (Suprasolv), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by the means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford, MA, USA). EPA-610 Polycyclic aromatic hydrocarbons mixture was supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA). Standard reference material (SRM) 2977 (mussel tissue) was purchased from the NIST (Gaithersburg, MD, USA). Potassium Hydroxide (Pellets, +85%, AC) was purchased by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Durapore filters (Millex GV, 13 mm, 0.22 µm) were supplied by Millipore, and silica (Sep-Pak, 500mg) and florisil (Sep-Pak, 900 mg) cartridges were obtained from Waters.

2.2. Samples and sample manipulation

To develop the optimization process two types of fish tissue materials were selected to represent low and high fat content fish tissues. Aquaculture turbot (<2% fat) and salmon (>15% fat) were selected to prepare stock materials to carry out the optimization process. One hundred and fifty grams of ground muscle was soaked with 15 mL of a PAHs solution in acetonitrile (B[a]A, B[k]F, and B[a]P and I[1,2,3-cd]P, 102 ng/mL; B[b]F and DB[a,h]A, 202 ng/mL each) stirring mechanically the mixture and then allowing to air dry at room temperature during 24 h with occasional mixing. Aliquots of the non-spiked materials were reserved as sample blanks. All spiked and non-spiked materials were then lyophilized and stored in amber glasses under 0 °C. All sample materials - turbot (Spanish origin), salmon (Norway), mussels, and lamprey (Galician) - were acquired from local markets.

The humidity percentage of fresh fish (76.5% for turbot, 62.9% for salmon) was evaluated gravimetrically. The residual percent of water in lyophilized materials was 8.3% (turbot) and 4.3% (salmon). The humidity of the mussel tissue reference material was 8.2%.

The lipid content of the different samples analyzed in this study was evaluated by the means of the Bligh and Dyer method [26]. The fat content in turbot was 1.7%, 16.6% for salmon, 1.3% for mussel tissue, and 22.4% for lamprey, all based in wet weight.

The method was developed to process 1 g of fresh fish sample (or 0.200 g of lyophilized materials reconstituted with 0.8 mL of ultrapure water). The sample is weighted in the extraction vessel, then 4 mL (although lower volumes may be used depending on the fat content of sample) of saturated methanolic potassium hydroxide solution and 10 mL of n-hexane are added, closing the vessel. The microwave-assisted extraction is carried out at 129 °C in 17 min. Once cooled, vessels are opened and 6.0 mL of the organic layer is transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 3000 rpm in 3 min. The centrifuged extract is evaporated to 0.5 mL in the Turbo Vap. Concentrated extracts are purified by passing through a silica cartridge activated with 4 mL of dichloromethane followed by 4 mL of hexane-dichloromethane (1:1 v/v). Analytes are eluted with 4 mL of hexane-dichloromethane (1:1) and the eluate concentrated to 0.5 mL in the Turbo Vap.

One milliliter of acetonitrile is added and the mixture is concentrated again to 0.5 mL. The final concentrated extract is transferred to a 2 mL volumetric flask containing 0.5 mL of ultrapure water, and the flask is made to mark with acetonitrile. The extract is filtered through a 0.22 μ m Durapore filter and 20 μ L is injected into the HPLC system.

2.3. Chromatographic separation

A binary solvent system made of acetonitrile and water was used for chromatographic separations at 0.4 mL/min flow rate. The gradient elution program was as follows: initial conditions, 47% ACN in 2 min, then a linear ramp to 90% ACN in 10 min and finally another linear ramp to 100% ACN in 8 min, holding in 100% for 10 min. The column temperature was maintained at 35°C.

Detection used fluorescence wavelength programming to perform better sensitivity and minimal interference. The fluorescence intensity was measured at the following excitation/emission wavelengths pairs: 286/410 nm for B[a]A (R_t =18.6 min), 294/425 nm for B[b]F (R_t =20.8 min), B[k]F (R_t =21.6 min), B[a]P (R_t =22.3 min) and DB[a,h]A (R_t =23.5 min), and 245/500 nm for I[1,2,3-cd]P (R_t =24.5 min).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Alkaline digestion at the extraction step

Extracts from foods, biological, and environmental matrices, contain not only the hydrophobic analytes of interest, but also several other hydrophobic compounds, frequently lipids. These co-extracted components not only interfere with the analytes but also frequently affect or damage the chromatographic column, decreasing its useful life and deteriorating the chromatographic system performance.

In the extraction of PAHs from fish samples, lipids digestion can be done as a previous step but the possibility of making digestion simultaneously with extraction reduces the time and manipulation of the samples, thus reducing the process costs and risk of errors, increasing the sample throughput.

In that case, methanolic potassium hydroxide was used to digest the lipids in the samples. To evaluate the amounts of potassium hydroxide needed to complete this process a series of experiments were carried out by varying the amount of alkali added, measuring the remaining fat in sample extracts after the MAE-digestion-extraction process. Results of these experiments have been summarized in Table 1. As can be expected, residues in extracts diminished as the amount of alkali increases and finally trend to a constant value.

Table 1 Amount of residue in the extracts, as a function of applied volume of methanolic potassium hydroxide solution.

Volume (mL)	Mussel average/SD (mg/mL) (n=3)	Lamprey average/SD (mg/mL) (n=3)	Turbot average/SD (mg/mL) (n=3)	Salmon average/SD (mg/mL) (n=3)
0.0	0.89/0.21	21.96/3.60	0.91/0.12	25.60/3.60
0.5	0.39/0.02	5.99/1.48	0.15/0.00	4.92/0.62
1.0	0.28/0.02	0.74/0.20	0.14/0.02	5.08/1.60
1.5	0.25/0.01	0.22/0.08	0.18/0.02	2.80/0.30
2.0		0.16/0.01		
2.5	0.26/0.06	0.12/0.01	0.13/0.01	0.79/0.17
3.0		0.15/0.04		0.31/0.02
3.5		0.22/0.06		0.46/0.03
4.0			0.11/0.01	0.19/0.01
5.0				0.20/0.01

The lower the fat content of sample material, the lower the amount of alkali needed to reach this constant value. 0.5-1.0 mL of methanolic potassium hydroxide is sufficient for turbot or mussel samples, whereas 2-4 mL are needed for lamprey and salmon samples. The conclusion is that fish samples having different fat content need different amount of alkali to warrant complete hydrolysis. From a practical point of view, working with an excess of alkali avoids the need of evaluating the fat content in samples. 4.0 mL of alkali provided satisfactory results with all types of samples tested in this study.

3.2. Optimization of extraction conditions

Once the amount of alkali is fixed, other operational parameters (solvent volume, temperature, and extraction time) should be studied and optimized. A

chemometrical approach based on experimental designs was applied to carry out this optimization process using the extraction yield for the six selected PAHs as the objective function. First a two-level screening fractional factorial 2^{3-1} (4 runs) was developed to evaluate the significance of the three operational factors. Levels for factors were as follows: temperature (105-130°C), solvent volume (10-20 mL) and extraction time (5-20 min). Evaluation of results for these four experiments indicated that temperature and the extraction time have a positive influence on extraction yield, while the solvent volume affects negatively. Consequently, a second fractional factorial design was developed moving the variable levels in the direction suggested by the former (see Fig. 1). The solvent volume was fixed in the low level (10 mL because the MAE vessels imposed a lower limit of 8 mL to work safely). Levels for temperature in that second experiment were 130-150 °C and the extraction time was investigated in the range 20-30 min. The evaluation of results in this second design shows that both factors have a negative effect in the extraction yields. This suggests the presence of a maximum inside the experimental region studied. To accurately locate this maximum a final pentagonal design with a central point and five replicates was developed evaluating the responses with the help of desirability functions [27,28]. Table 2 gives the experimental plan and results for runs. Individual desirability functions were defined for each analyte and these individual functions were combined to an overall desirability function that reflects the success in extracting the six PAHs from samples. Fig. 1 shows the two-dimensional plot of this overall desirability function in the experimental domain studied. Gray regions represent null desirability and, thus, unsuitable experimental conditions. The maximum in the desirability surface may be calculated to give the optimal experimental conditions in the extraction of PAHs from fish samples. This optimum appears at 129 °C and 17 min of extraction in a wide optimal region thus indicating the attainment of a robust solution.

Two independent optimization processes were developed, one for low fat fish samples (turbot) and the other for high fat content samples (salmon). Essentially, the results were completely similar in both studies, although for high fat content material, increased variability produced a calculated response surface without statistically significant curvature in the region of the optimum devised for low fat samples. This indicated that both types of materials can be processed without significant differences in the operational parameters for extraction, which is

very important from a practical point of view, if the proposed procedure should be applied for routine determinations.

Table 2 Experimental plan and response values in the pentagonal design (see Fig. 1).

Run	Time (min)	Temperature (°C)	B[a]A (ng/g)	B[b]F (ng/g)	B[k]F (ng/g)	B[a]P (ng/g)	DB[a,h]A	I[1,2,3-cd]P
1	15	140	16.35	39.15	19.15	18.97	40.80	17.46
2	25	133	21.28	48.88	24.57	24.43	51.28	22.80
3	21	122	18.88	44.80	21.77	23.40	43.53	20.22
4	9	122	22.19	47.27	23.20	23.92	44.31	20.92
5	6	133	19.63	42.12	20.61	21.59	42.30	18.98
6	15	130	23.03	51.05	25.24	26.60	50.78	23.13

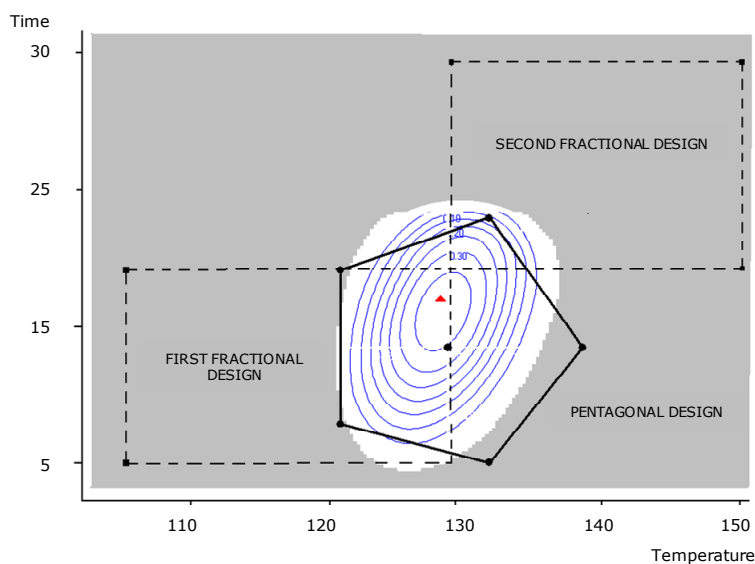


Fig. 1. Desirability surface with the experimental designs developed in the optimization study and the located optimum.

3.3. Clean up of extracts

The extracts produced in the above mentioned optimum conditions need further clean-up to avoid interferences and protect column from damage. Among the several clean procedures developed for PAHs extracts, those based on solid-phase extraction are the most convenient in practice. In the case of fish extracts,

satisfactory results have been reported for silica [29] and florisil. Both types of sorbents were studied in our case and Table 3 summarizes the results of this study, indicating the conditioning and elution solvents applied in each case and the fat residue in extracts. Our results indicate that silica performs better than florisil. Notice that the constant residue for salmon in Table 1 (0.19 mg/mL) is now reduced to 0.04 mg/mL. In these experiments additional insight was obtained by registering the UV and fluorescence signals for extracts. Thus, the appreciation of the enhanced performance of silica cartridges as compared to florisil was based not only in the residue evaluation but also on the profiles and baselines of the corresponding chromatograms. Fig. 2 depicts typical chromatograms obtained for turbot and salmon extracts working in the optimal conditions described.

Table 3 Amount of residue in salmon extracts after two different clean-up procedures.

Solid sorbent	Conditioning solvent	Elution solvent	Residue average/SD (mg/mL) (n=3)
Silica (500 mg)	4 mL dichloromethane	4 mL n-hexane-dichloromethane (1:1)	0.040/0.008
	4 mL n-hexane-dichloromethane (1:1)		
Florisil (900 mg)	5 mL Acetonitrile	5 mL Acetonitrile	0.100/0.020
	4 mL dichloromethane	4 mL n-hexane-dichloromethane	0.060/0.002
	4 mL n-hexane-dichloromethane (1:1)	(1:1)	
	5 mL Acetonitrile	5 mL Acetonitrile	0.200/0.030

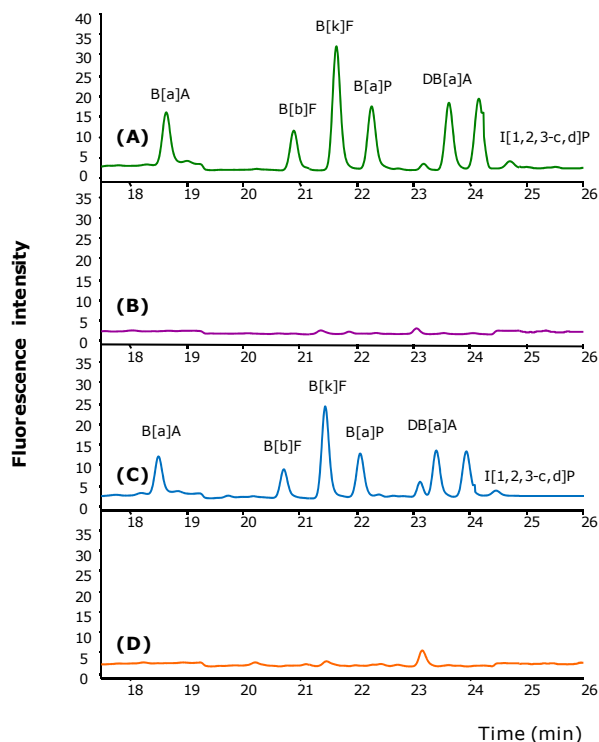


Fig. 2. Chromatograms of the extracts from spiked turbot (A), non-spiked turbot (B), spiked salmon (C), and non-spiked salmon (D).

3.4. Performance of the analytical procedure

Calibration curves at five levels were prepared. Each calibration level was injected twice. Table 4 summarizes concentration ranges and other calibration figures of merit, as well as the detection (LOD, $s/n = 3$) and quantification (LOQ, $s/n = 10$) limits. As can be seen, all the analytes can be quantified far below the most restrictive limit imposed by the European Union [7] for B[a]P (2 ng/g wet weight) and obviously below the limits imposed by the French and Spanish governments after the Erika and Prestige oil spills.

Table 4 Regression analysis, LODs and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	Calibration range (ng/mL)	Calibration equation	Slope standard error	Intercept standard error	Correlation coefficient	LOD S/N=3 (ng/g) ^a	LOQ S/N=10 (ng/g) ^a
B(a)A	0.1-20	$y=82.026x-3.8417$	0.126	1.269	1.0000	0.3	0.9
B(b)F	0.2-40	$y=28.947x-1.7545$	0.169	3.397	0.9997	0.5	1.6
B(k)F	0.1-20	$y=183.94x-4.1617$	0.742	7.461	0.9999	0.1	0.2
B(a)P	0.1-20	$y=109.47x-10.868$	0.423	4.252	0.9999	0.1	0.4
DB(a,h)A	0.2-40	$y=47.305x+2.2195$	0.402	8.078	0.9994	0.2	0.8
I(1,2,3-cd)P	0.1-20	$y=10.093x-1.4258$	0.064	0.643	0.9997	0.5	1.8

^a Concentration on dry weight basis.

Reproducibility was assessed by the series of five independent experiments carried out on different days using the stock turbot and salmon material. Average concentrations and between days precision are reported in table 5. All those results are expressed on dry weight basis.

Table 5 Reproducibility and recovery study.

Compound	Turbot samples				Salmon samples			
	Average (ng/g) (n=5)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)	Average (ng/g) (n=5)	RSD (%)	Recovery (%)	RSD (%)
B(a)A	22.7	0.5	92.3	4.2	14.2	1.5	87.8	3.1
B(b)F	51.4	0.3	94.0	4.9	32.0	0.7	93.0	4.2
B(k)F	25.3	0.2	92.2	4.9	16.6	0.7	96.6	0.9
B(a)P	27.3	0.8	94.4	3.1	16.8	1.8	98.3	4.2
DB(a,h)A	50.7	0.2	85.8	2.4	41.0	1.8	92.3	3.2
I(1,2,3-cd)P	24.5	0.8	91.9	2.5	17.0	0.6	86.1	5.4

Recoveries were evaluated by freshly spiking portions of the stock blank materials at different concentration levels. Recoveries were calculated as the slope of the addition graph, appearing in the 85-100% range for the different analytes with relative standard deviations lower than 5% (see Table 5).

Further, to check the performance of the complete analytical procedure developed, five portions of 0.2 g of the NIST SRM 2977 mussel tissue were processed according to described procedures for extraction and clean up. This material has certified concentrations for all the analyzed PAHs except for benzo[k]fluoranthene (reference value). Average concentrations and confidence

intervals are summarized in Table 6. Measurements were not corrected for recoveries, providing a further confirmation of the recovery values shown in Table 5. As can be seen from Table 6, obtained results are in good agreement with the certified values.

Table 6 Measured concentrations and confidence intervals vs. certified one in NIST SRM 2977.

Compound	Certified (ng/g)	Measured (ng/g) $(\bar{x} \pm 2SD) (n=5)$
B(a)A	20.34 ± 0.78	20.4 ± 1.4
B(b)F	11.01 ± 0.28	10.2 ± 1.3
B(a)P	8.35 ± 0.72	7.0 ± 2.2
DB(a,h)A	1.41 ± 0.19	1.5 ± 0.6
I(1,2,3-cd)P	4.84 ± 0.81	4.1 ± 0.8

4. CONCLUSIONS

The developed procedure allows the quick and efficient extraction of all regulated PAHs in fish samples by simultaneously hydrolyzing the fats in samples and extracting the hydrocarbons of interest in hexane. Further clean up of extracts with silica cartridge provides clean enough solutions easily analyzable by HPLC with fluorimetric detection. The solvent exchanging process might eventually be omitted if other chromatographic techniques are applied to MAE extracts.

Although quite logically, the amount of alkali needed in the hydrolysis process is dependent on the fat content in samples, an excess can be used that avoids the need of evaluating this fat content and makes the procedure easily adaptable to routine determinations. The procedure shows good recoveries and satisfactory reproducibility, allowing the quantification of all the regulated PAHs far below the currently regulated concentration levels.

Acknowledgements

This research was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project BQU2003-02090) and the Xunta de Galicia (project PGIDIT04PXIC23701PN).

REFERENCES

- [1] T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A.D. Campiglia, *Talanta* 47 (1998) 943.
- [2] R.G. Harvey, *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Wiley-VCH, New York, 1996.
- [3] C.F. Moffat, K.J. Whittle, in: C.F. Moffat and K.J. Whittle (Eds.), *Environmental Contaminants in Food*, Sheffield Academic Press, Sheffield 1999, p.364.
- [4] Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, vols. 43-53, International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, 1991.
- [5] Integrated Risk Information System (IRIS): Summaries for Benz[a]anthracene , Chrysene, Benzo[b]fluoranthene, Benzo[k]fluoranthene, Benzo[a]pyrene, Dibenzo[a,h]anthracene and Indene[1,2,3-cd]pyrene. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 1994, <http://www.epa.gov/iriswebp/iris/index.html>.
- [6] Sampling and Analysis Procedure for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants, US Environmental Protection Agency Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, 1997.
- [7] European Commission: Scientific Committee on Food SCF/CS/CNTM/PAH /29Final 4 December 2002: Opinion of the Scientific Committee on Food on the risk to human health to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food, http://europe.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/out153_en.pdf
- [8] J.P. Meador, J.E. Stein, W.L. Reichert, U. Varanasi, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 143 (1995) 79.
- [9] R. J. Law, C. Kelly, K. Baker, J. Jones, A. D. McIntosh and C. F. Moffat, *J. Environ. Monit.* 4 (2002) 383.
- [10] D.H. Phillips, *Mutat. Res.* 443 (1999) 139.
- [11] U. Varanasi, D.J. Gmur, *Biochem. Pharmacol.* 29 (1980) 753.
- [12] U.S. EPA Guidance for Assessing Chemical Contaminant Data for Use in Fish Advisories, vol. 1, Fish Sampling and Analysis, third ed., document EPA 823-B-00-007, Washington, DC, November 2000.

- [13] Commission Regulation (EC) 208/2005 2-4-2005 amending Regulation (EC) 466/2001 as regard polycyclic aromatic hydrocarbons. Off. J. Eur. Union, N° L34/3 8-2-2005.
- [14] Informe sobre repercusiones del vertido del "Prestige" en la Seguridad Alimentaria. Agencia Española de Seguridad Alimentaria: Ministerio de Sanidad y Consumo, <http://otvm.uvigo.es/investigacion/informes/documentos/AESA/PRESTIGEOctubre2003.pdf>.
- [15] Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments, Avis du group d'experts réunis par l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments sur les critères de toxicité alimentaire présentés par la pollution engendrée par le naufrage de l'Erika, February 2000 (<http://www.afssa.fr/ftp/afssa/basedoc/a000205.pdf>)
- [16] K.D. Bartle, in: C.S. Creaser, R. Purchase (Eds.), Food Contaminant, Sources and Surveillance, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1991, p. 41.
- [17] M.S. García-Falcón, S. González, M.A. Lage and J. Simal, Food Addit. Contam. 16 (1999) 9.
- [18] D.S. Page, R.J. Huggett, J.J. Stegeman, K.R. Parker, B. Wooding, J.S. Brown, A.E. Bence, Environ. Sci. Technol. 38 (2004) 4928.
- [19] I. Vives, J.O. Grimalt, P. Fernandez, B. Rosseland, Sci. Total Environ. 324 (2004) 67.
- [20] G. Wang, A.S. Lee, M. Lewis, B. Kamath and R. K. Archer, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 1062.
- [21] Md. Yeakub, A.H. Richard, B. Cole, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 923.
- [22] L. Pensado, C. Casais, C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 103.
- [23] L. Pensado, C. Casais, C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 869 (2000) 505.
- [24] E. Vázquez, P. López, S. Muniategui, D. Prada, E. Fernández, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 295.
- [25] P. Villar, M. Callejón, E. Alonso, J.C. Jiménez, A. Guiraúm, Anal. Chim. Acta 524 (2004) 295.

- [26] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens, J. Food Comp. Anal. 14 (2001) 93.
- [27] G. Derringer, R. Suich, J. Qual. Technol. 12 (1980) 214.
- [28] D. Mathieu, J. Nony, R. Phan-Tan-Luu, Nemrod W (Experimental matrices generation as a function of objectives and experimental response treatments' LPRAI, Univ. Aix-Marseille III, Marseille, France, 2000.
- [29] C. Sobrado, M.C. Quintela, J.C. Gonzalez, J.M. Vieites, J. Aquat. Food. Prod. Technol. 13 (2004) 93.

1.1.3. CONSIDERACIONES ADICIONALES Y CONCLUSIONES

El objetivo fundamental de este trabajo era el desarrollo de un método de determinación de PAHs en pescados, utilizando **MAE** seguido de **HPLC-Flu**.

El alto contenido lipídico que presentan generalmente las muestras biológicas, resultaba en principio, uno de los principales problemas, considerando el carácter apolar de los analitos. La separación de los PAHs de la materia grasa, a la que generalmente están unidos, se presentaba como una tarea realmente complicada.

Frente a esta problemática surge la idea de realizar la saponificación de las grasas, de manera simultánea a la extracción de los analitos, utilizando una disolución saturada de hidróxido de potasio en metanol. El estudio del **porcentaje graso** de cada pescado, así como la determinación del volumen de potasa metanólica, necesaria para la **hidrólisis de la grasa**, proporcionó información acerca de la cantidad de potasa que se debe añadir para llevar a cabo la saponificación de los lípidos y la extracción de PAHs simultáneamente. Se encontró una relación lógica entre la cantidad de grasa y la cantidad de potasa necesaria para la hidrólisis. Pescados con un alto contenido graso requerían un mayor volumen de potasa para hidrolizar los lípidos existentes.

Desde el punto de vista práctico, para evitar la etapa de determinación de la grasa de cada una de las muestras, antes de su análisis, se recomienda trabajar con un exceso de disolución alcalina. Utilizando 4 mL de potasa se obtienen resultados satisfactorios para todo tipo de muestras.

Las variables de extracción (temperatura, tiempo y volumen de disolvente) se han optimizado mediante **diseño de experimentos**, desarrollando dos procesos de optimización independientes, en función del contenido graso de las muestras. Mediante el uso de herramientas quimiométricas, se realizó una experimentación efectiva mediante una estrategia que proporciona la información deseada en un número razonable de ensayos, con un ahorro de tiempo y dinero considerable.

La limpieza de los extractos se realiza mediante **SPE**, con un cartucho de sílice. Mediante una etapa simple de purificación, se reducen las interferencias presentes en el extracto, sin la necesidad de un gasto excesivo de disolventes.

1. MUESTRAS SÓLIDAS

Estudios de reproducibilidad y de recuperación confirman que las extracciones llevadas a cabo con las condiciones experimentales optimizadas, conducen a resultados satisfactorios para los compuestos de interés, ya que trabajando en condiciones óptimas, se consigue la extracción cuantitativa de los PAHs estudiados (**86-98%**).

Los límites de cuantificación alcanzados (**0.07- 0.53 ng g⁻¹**), se encuentran muy por debajo de los límites legislados para estos compuestos en muestras de pescado.

Así, en este trabajo se ha desarrollado una metodología analítica, que permite llevar a cabo la saponificación de los lípidos de la muestra y la extracción de los analitos de manera simultánea, obteniendo excelentes recuperaciones y límites de cuantificación para todos los compuestos estudiados, reduciendo el tiempo de análisis, la manipulación de las muestras, el coste del proceso y los riesgos de error.

1.2. DETERMINACIÓN DE PAHs EN SUELOS Y LODOS DE DEPURADORA DE AGUAS RESIDUALES

1.2.1. INTRODUCCIÓN

Una gran parte de esta Tesis Doctoral estuvo enfocada hacia el desarrollo de metodología analítica para la determinación de PAHs en muestras de **suelo y lodo de depuradora de aguas residuales**.

El lodo es un producto secundario obtenido en las plantas de tratamiento de aguas residuales, que suele utilizarse con fines agrícolas, como fertilizante del suelo. Sin embargo, debido a los procesos físico-químicos que tienen lugar durante el tratamiento de las aguas (efluentes industriales y domésticos, aguas de escorrentía, etc.), los lodos tienden a concentrar grandes cantidades de contaminantes, principalmente de naturaleza hidrofóbica (PAHs), que presentan una elevada tendencia a adsorberse en las partículas de los mismos. Su uso como fertilizante, implica que una cantidad importante de sustancias indeseadas, pasen a los suelos agrícolas. Por lo tanto, es necesario controlar las condiciones de aplicación, para evitar el posible efecto nocivo, sobre el suelo, las aguas, la vegetación, los animales y la salud humana. Resulta de especial importancia, evaluar el tipo de contaminantes y sus niveles de concentración en ambas matrices, para la puesta en marcha de posibles medidas; de ahí, que surja la necesidad, de desarrollar métodos analíticos sensibles, que permitan la determinación de contaminantes en lodos y suelos.

Los lodos están considerados como una de las matrices medioambientales más complejas que existen, ya que por un lado, presentan una gran cantidad de contaminantes, y por otro, contienen elevadas cantidades de materia orgánica, especialmente sustancias lipídicas. Por su parte, los suelos también constituyen una matriz compleja, debido principalmente a la fuerte adsorción de los PAHs, a la materia orgánica y los ácidos húmicos presentes en los mismos, que a menudo dificulta la extracción.

La finalidad de este trabajo, no se centra únicamente en el desarrollo de métodos de análisis, sino que se pretende optimizar métodos, lo más rápidos y sencillos posible, reduciendo el tiempo y el gasto de disolvente, de modo que sean adecuados para cualquier laboratorio de análisis, que se dedique a controles

1. MUESTRAS SÓLIDAS

rutinarios de este tipo de muestras. Así, se han desarrollado diferentes metodologías, que se diferencian fundamentalmente en la etapa de preparación de muestra.

En el trabajo desarrollado anteriormente (**Capítulo 1.1**), se han planteado una serie de ventajas asociadas a la saponificación simultánea a la extracción, para muestras de pescado. El tratamiento alcalino no sólo ejerce un efecto claramente positivo en la limpieza de los extractos resultantes, sino que favorece la recuperación de los PAHs. En base a estas premisas, surge la posibilidad de desarrollar un procedimiento similar de preparación de muestra para lodos y suelos. Así, en la primera de las metodologías desarrolladas, se utiliza una disolución de hidróxido potásico en metanol y extracción asistida por microondas (MAE) para llevar a cabo simultáneamente la saponificación de los lípidos y la extracción de los analitos en muestras de lodo y suelo.

Una de las técnicas de preparación de muestra sólida que presenta mayores ventajas en términos de rapidez, simplicidad y bajo coste, es **MSPD**. En principio, plantearse la extracción de los PAHs de matrices tan complejas, como los suelos y los lodos, utilizando una técnica de extracción supuestamente poco enérgica, resultaba un poco arriesgado. Sin embargo, el desarrollo de un procedimiento de preparación de muestras de esta naturaleza, utilizando una técnica tan sencilla, suponía un importante avance desde el punto de vista analítico, por lo que este trabajo se presentaba como un gran reto.

Finalmente, **PLE** fue la técnica elegida para el desarrollo de un método, que permita la extracción de un número elevado de muestras, de manera automatizada. El principal inconveniente que se plantea, está relacionado directamente con la limpieza de los extractos. Utilizando una técnica tan enérgica, donde la extracción tiene lugar a elevadas temperaturas y presiones, los extractos resultantes suelen presentar un número elevado de interferencias, que dificultan la determinación de los analitos.

HPLC-Flu fue la técnica de determinación utilizada en el desarrollo de las diferentes metodologías, mientras que **PTV-LVI-GC-MS/MS** se utilizó con fines de confirmación y validación.

Los resultados obtenidos se resumen en las publicaciones que se incluyen a continuación.

1.2.2. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO Y SUELO MEDIANTE EXTRACCIÓN Y SAPONIFICACIÓN ASISTIDAS POR MICROONDAS

Publicación II. "Sample preparation of sewage sludge and soil samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on one-pot microwave-assisted saponification and extraction", *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2559 (Pág. 199).

1.2.3. OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA BASADO EN LA DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN SUELO

Publicación III. "Optimization of the matrix solid-phase dispersion sample preparation procedure for analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils: Comparison with microwave-assisted extraction", *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 32 (Pág. 219).

1.2.4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS DE LODO

Publicación IV. "Development of a matrix solid-phase dispersion method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples" *Anal. Chim. Acta* 626 (2008) 155 (Pág. 241).

1.2.5. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO MEDIANTE EXTRACCIÓN SELECTIVA CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Publicación V. "Development of a sample preparation procedure of sewage sludge samples for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons based on selective pressurized liquid extraction" *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 425 (Pág. 271).

**1.2.2. PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO
Y SUELO MEDIANTE EXTRACCIÓN Y SAPONIFICACIÓN ASISTIDAS
POR MICROONDAS**

Publicación II

**SAMPLE PREPARATION OF SEWAGE SLUDGE AND SOIL SAMPLES
FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC
HYDROCARBONS BASED ON ONE-POT MICROWAVE-ASSISTED
SAPONIFICATION AND EXTRACTION**

Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2559

Doi:10.1007/s00216-006-1110-1

SAMPLE PREPARATION OF SEWAGE SLUDGE AND SOIL SAMPLES FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BASED ON ONE-POT MICROWAVE-ASSISTED SAPONIFICATION AND EXTRACTION

M^a Teresa Pena, Luis Pensado, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, Rafael Cela

Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

Abstract

A microwave-assisted sample preparation (MASP) procedure was developed for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge and soil samples. The procedure involved the simultaneous microwave-assisted extraction of PAHs with n-hexane and the hydrolysis of samples with methanolic potassium hydroxide. Because of the complex nature of the samples the extracts were submitted to further cleaning with silica and Florisil solid-phase extraction cartridges connected in series. Naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[e]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, benzo[g,h,i]perylene, and indeno[1,2,3-cd]pyrene, were considered in the study. Quantification limits obtained for all of these compounds (between 0.4 and 14.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$ dry mass) were well below of the limits recommended in the USA and EU. Overall recovery values ranged from 60 to 100%, with most losses being due to evaporation in the solvent exchange stages of the procedure, although excellent extraction recoveries were obtained. Validation of the accuracy was carried out with BCR-088 (sewage sludge) and BCR-524 (contaminated industrial soil) reference materials.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Microwave-assisted saponification-extraction; Soil analysis, Sewage sludge analysis.

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are mainly introduced into the environment via the incomplete combustion of fossil fuels, organic matter, coke, or petroleum [1,2]. Wastewater catchments receive PAHs from different sources such as industrial and domestic fossil fuel spillages and urban runoff, which flushes hydrocarbons deposited on the ground surface from vehicles or heating facilities [3]. As PAHs are highly hydrophobic, they are readily adsorbed onto suspended sludge particles in wastewater treatment plants [4]. This results in the formation of sewage sludges that typically contain between 0.02 and 25 mg kg⁻¹ dm (on a dry mass basis) of each of different PAHs [5-9].

Sewage sludge can be disposed of in different ways, e.g., in controlled waste landfill sites, by application as a fertilizer to agricultural land and by incineration. The application of the sludge as fertilizer may lead to an increase in the PAH content of agricultural soils, which in turn may cause damage to soil organisms and adverse effects on crops [10], as well as contamination of human food chains [11]. The current interest in PAHs in sewage sludge is because of their persistence in soil, their low biodegradability, high lipophilicity, their ultimate fate in agricultural systems, biomagnification in the food chain, possible harmful effects on biota, and carcinogenicity in humans [12].

A 3rd draft of a European Union (EU) directive aimed at establishing the total concentration of PAHs allowed in sewage sludge destined for agriculture has recently been published [13]. The EU has proposed that the sum of 11 selected PAHs -acenaphthene (Ace), phenanthrene (Phe), fluorene (Flu), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[j]fluoranthene (B[j]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[a]pyrene (B[a]P), benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) and indeno[1,2,3-cd]pyrene (I[1,2,3-cd]P)- should not exceed 6 mg kg⁻¹ dm (dry mass basis). The maximum level admitted in USA regulations is 4.6 mg kg⁻¹ dm (calculated as the sum of benz[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chry), B[b]F, B[k]F, B[a]P, dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A) and I[1,2,3-cd]P, although the maximum concentration for B[a]P is 1.0 mg kg⁻¹) [11]. Maximum acceptable limits for three PAHs, Flt (5.0 mg kg⁻¹ dm), B[b]F (2.5 mg kg⁻¹ dm), B[a]P (2.0 mg kg⁻¹ dm), were established in France in 1998 [14]. Similarly, maximum allowable concentrations of 3.0 mg kg⁻¹ dm were established in Sweden in 1996 for six PAHs

(Flt, B[a]P, B[b]F, B[k]F, B[g,h,i]P and I[1,2,3-cd]P) in sludge used for soil amendment [15].

Selective extraction of specific compounds from sewage sludge is recognized as a very complicated task because sludge samples contain a large variety of components and contaminants that differ in polarity and chemical nature, in addition to large amounts of carbon. Highly efficient methods of extraction and sample clean-up of extracts are therefore required to allow accurate analytical determinations.

Supercritical fluid extraction (SFE), pressurized liquid extraction (PLE; Dionex trade name ASE for accelerated solvent extraction), microwave-assisted extraction in closed (MAE) and open (FMAE) vessels, and also subcritical water extraction have been developed as alternative techniques to the classical Soxhlet and ultrasonic extractions in soil [16-19], sludge [20-22] and sediment [23,24] samples.

It has also been shown that alkaline treatment of raw extracts reduces the attachment of PAHs to the greasy lipidic fraction of sludges, thereby facilitating sample extraction and clean-up [25]. Treatment of soil organic matter by methanolic hydrolysis also provides better solvent accessibility and extractability of organic contaminants from sewage sludge-amended arable soil [26]. An explanation for the observed effect could be that PAH molecules, which got trapped in the humic polymer, are released due to the cleavage of ester bonds which form parts of humic macromolecules [27]. To our knowledge, microwave-assisted extraction has not been reported for the simultaneous extraction of PAHs and the hydrolysis of sample lipidic material from sludge or soil samples.

However, solvent co-extraction of residual lipidic materials with the low-polarity analytes in real sludge samples appears unavoidable in practice. Additional cleaning of extracts is therefore needed so that samples can be analyzed by chromatography. Otherwise, co-extracted components not only interfere with the analytes but also often damage the column. Solid-phase extraction is commonly used to clean extracts. The most common solid phases used in PAH determination are C18-octadecyl, C8-octyl, silica, and Florisil [28].

The aim of the present study was to develop and evaluate a microwave-assisted saponification-extraction-based procedure for the determination of 16

PAHs, including those considered in European and USA regulations regarding sewage sludge and soil samples. The 16 PAHs are naphthalene (Naph), Ace, Flu, Phen, anthracene (Anth), Flt, Pyr, B[a]A, Chry, benzo[e]pyrene (B[e]P), B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, B[g,h,i]P, and I[1,2,3-cd]P. The alkaline digestion stage required for processing lipids and for enhancing solvent accessibility and extractability of organic contaminants was carried out at the same time as the extraction. A certified sludge (BCR 088) and a certified industrial soil (BCR 524), prepared by the European Community Bureau of Reference, were processed to validate the accuracy of the procedure.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Apparatus and reagents

Sample extractions were performed using an Ethos E-320 (1,000 W) microwave extraction system (Milestone, Leutleirch, Germany) equipped with 12 vessels each with a nominal volume of 100 mL. The maximum values of temperature and pressure inside the extraction vessels are 260 °C and 35 bar (500 psi).

HPLC chromatographic separations were developed in a system comprising a 600E pump with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA), UV/Visible diode array and fluorescence detectors in series (HP Series 1100, Agilent, Waldbrom, Germany). The injector was a Rheodyne Model 7725i (Cotati, CA, USA), fitted with a 20- μ L loop. Pre-column and analytical column temperatures were controlled by means of a MetaTherm 9540 oven (MetaChem, Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 2.1-mm-I.D. Vydac 201TP52 column, with a particle size of 5 μ m. A 30 mm x 2 mm guard column Vydac 201TP was used to protect the analytical column (both were purchased from Agilent). Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]) was used for data acquisition.

Elemental analyses were carried out at shared research facilities in the University of Santiago de Compostela.

A Unicen (Orto-Alresa, Madrid, Spain) centrifuge was used for centrifugation of raw sample extracts. Solvent evaporation was carried out with a Turbo Vap II automated nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA).

Acetonitrile and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), n-hexane, chloroform, acetone and dichloromethane (Suprasolv) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford MA, USA). EPA-610 polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and benzo[e]pyrene (B[e]P) (solid, 98.5%) were supplied by Supelco (Bellefonte PA, USA). Potassium Hydroxide (Pellets, 85%+, AC) and Florisil (60-100 mesh) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and silica gel 60 (0.040-0.063 mm) was obtained from Merck. Standard reference materials (CRMs) BCR 088 and BCR 524 were supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium).

Durapore filters (Millex GV, 13 mm, 0.22 μm) were supplied by Millipore. Silica (Sep-Pak, 500 mg) and Florisil (Sep-Pak, 900 mg) cartridges were obtained from Waters.

2.2. Samples and sample manipulation

Sewage sludge samples used to develop and optimize the procedure were obtained in 2000, during interlaboratory exercises. The material was obtained as an homogenized dried powder. The reference materials, BCR 088 and BCR 524 are dried sewage sludge and contaminated industrial soil, respectively. A sample of contaminated agricultural soil was taken in Louro (Galicia, northwest Spain) a region importantly affected by forest fires in 2006 and previous years. Thus, appreciable levels of analytes may be anticipated.

The humidity of the materials (5.8% for sludge sample, 12.1% for BCR 088, 2.7% for BCR 524 and 7.6% for the agricultural soil) was gravimetrically evaluated after drying sample portions of materials in an oven at 105 °C for 2 h.

The lipid content of samples (3.8% for sample sludge, 9.0% for BCR 088 and 2.1% for BCR 524, all expressed on a dry mass basis) was evaluated by means of the Bligh and Dyer method [29]. The total carbon, nitrogen and sulphur contents of the materials were 17.3%, 1.1% and 0.5%, respectively, for the sample sludge; 27.1%, 3.1% and 1.6% for BCR 088; 11.9%, 0.17% and 0.06% for BCR 524; and 2.74%, 0.10% and 0.00% for the agricultural soil material.

The saponification-extraction method for PAHs was adapted from the optimized procedure for fish and biota samples as developed in our laboratory [30]. For this, 0.2 g of dried sample is placed in the microwave extraction vessel and soaked with 0.8 mL of ultrapure water. Four mL of saturated methanolic potassium hydroxide solution and 10 mL of n-hexane are then added, and the vessel is closed. Microwave-assisted saponification-extraction is carried out at 129 °C for 17 min. Once cooled, the vessels are opened and the organic and aqueous layers transferred to a centrifuge tube and centrifuged at 3,000 rpm for 3 min. Two mL of centrifuged organic extract is then evaporated to 0.5 mL in the Turbo Vap. Concentrated extracts are purified by passage through silica and Florisil cartridges (connected in series) activated with 4 mL of dichloromethane, followed by 4 mL of hexane/dichloromethane (1:1, v/v). Analytes are eluted with 8 mL of hexane/dichloromethane (1:1) and the eluate again concentrated to 0.5 mL in the Turbo Vap. One mL of acetonitrile (ACN) is added and the mixture again concentrated to 0.5 mL. The final concentrated extract is then transferred to a 2-mL volumetric flask containing 1 mL of ultrapure water, and the volume made to the mark with acetonitrile. The extract is then filtered through a 0.22- μ m Durapore filter and between 2 and 20 μ L injected into the HPLC system, depending on the concentration of PAHs in the samples.

2.3. Chromatographic separation

Samples were eluted using the following binary solvent (acetonitrile/water) gradient program: initial conditions, 47% ACN for 2 min, then a linear ramp to 90% ACN in 10 min, and finally another linear ramp to 100% ACN in 8 min, holding at 100% for 10 min. Column temperature was maintained at 35 °C and mobile phase flow rate was 0.4 mL min⁻¹.

Detection included fluorescence wavelength programming for better sensitivity and minimal interference. The fluorescence intensity was measured at the following excitation/emission wavelength pairs (nm): 267/330 for Naph; 275/315 for Ace and Flu; 247/357 for Phen; 238/418 for Anth, Flt and Pyr; 286/410 for B[a]A; 270/393 for Chry; 294/425 for B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A and B[ghi]P; and 245/500 for I[1,2,3-cd]P.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Alkaline digestion of samples during extraction and clean-up of extracts

Preliminary experiments in the microwave-assisted extraction of PAHs from sludge were carried out to test acetonitrile, dichloromethane, acetone, hexane/acetone (1:1, v/v) and hexane as extractants, without alkaline digestion of samples. Subsequent clean-up of the extracts were performed by solid-phase extraction with silica or/and Florisil cartridges and hexane/dichloromethane (1:1, v/v) as eluent. Irrespective of the extractant used, significant fluorescence background signals were always detected in the chromatograms. Dark extracts were obtained when hexane/acetone or acetone were used as extractants. Moreover, when using acetone some material precipitated during the solvent exchange following clean-up. A systematic evaluation of alternative methods was therefore carried out to avoid excessive co-extraction of matrix along with the analytes. For evaluation of the results of this series of experiments, both the dry weight of the residue and the chromatographic baseline profile of extracts were taken into account (see Fig. 1a and b). As expected, the greater the amount of residue in the extracts the greater the interference in chromatograms. Thus, the weight of residue in extracts was used as the primary criterion for comparing the obtained results in Table 1, in which several sample preparation schemes for PAHs in sludge, including alkaline treatments, are summarized.

For reference purposes, the weight of residue obtained after extracting the sludge with hexane/acetone (1:1), a very common solvent for MAE of soils and sediments, was used (Table 1). With hexane only (note that in all experiments, the sludge samples were wetted with water to allow microwave heating during extraction), three times less residue was obtained. Inclusion of a simultaneous alkaline digestion stage during MAE forced ionization of acidic compounds such as phenolic derivatives and humic substances, hindering their transfer to the non-polar extracting solvent and releasing analytes associated to these matrix components. Although alkaline hydrolysis apparently produced only a slight decrease in the amount of residue co-extracted, chromatographic profiles (Fig. 1b) and recoveries evaluation indicated that this treatment has a strong positive effect. For the most of

the analytes, recoveries not using alkaline hydrolysis are in the range 40-60% lower. Thus, alkaline treatment was included in all further experiments.

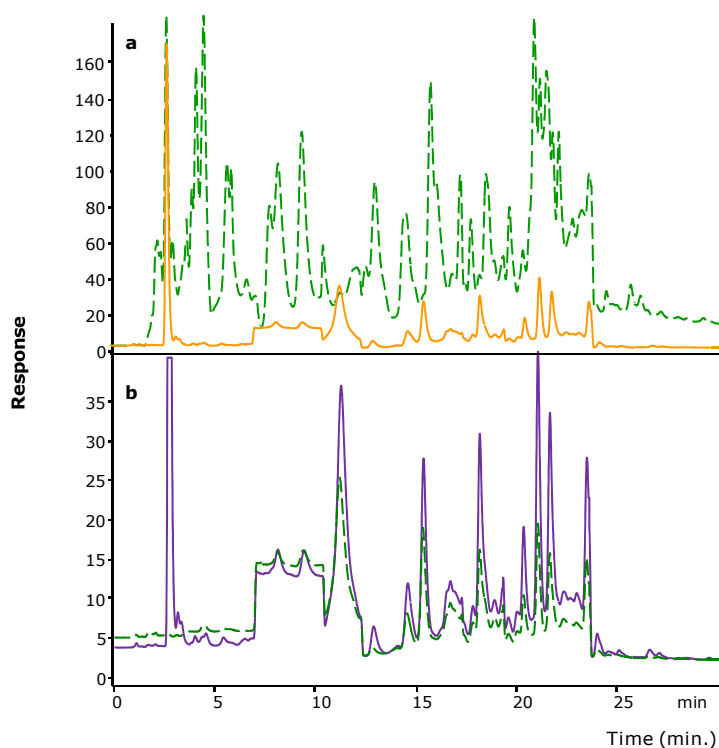


Fig. 1 Influence of extractant solvent, saponification, and clean-up procedures in the chromatographic profiles of MASP sewage sludge extracts produced. **a** Influence of extractant solvent: *dashed line* acetone/hexane (1:1) KOH addition and clean-up; *solid line* hexane KOH addition and clean-up. **b** Influence of saponification and clean-up in hexane extracts: *dashed line* clean-up but no KOH addition; *solid line* KOH addition and clean-up.

Table 1 Amount of residue in sewage sludge extracts after application of different extraction and clean-up procedures (in all cases, dried sludge sample portions were wetted to allow heating by microwave).

Extractant	Clean-up			Residue (mg g ⁻¹ sample) ^b
	Solid sorbent	Conditioning solvent	Elution solvent	
Hexane/acetone (1:1)	-			45.2 ± 0.7
Hexane	-			15.4 ± 0.3
Saturated KOH in methanol/hexane	-			12.8 ± 0.5
	Silica (250 mg) ^a			10.5 ± 0.2
	Silica (2 g) ^a			10.9 ± 1.4
	Florisol (2 g) ^a			9.6 ± 2
Saturated KOH in methanol/hexane	Silica (500 mg)	4 mL CH ₂ Cl ₂	4 mL CH ₂ Cl ₂ /hexane	4.3 ± 0.1
		4 mL CH ₂ Cl ₂ /hexane (1:1)	(1:1)	
		4 mL CH ₂ Cl ₂		
	Florisol (900 mg)			4.2 ± 0.1
	Silica+Florisol (500 mg+900 mg)		8 mL CH ₂ Cl ₂ /hexane (1:1)	2.9 ± 0.2
	Silica+Florisol (500 mg+900 mg)	5 mL ACN	5 mL ACN	10.5 ± 0.3

^a Bulk sorbents were placed in the extraction vessel. ^b Average of two determinations ± standard deviation.

Several clean-up schemes were then assayed (Table 1) to provide sample extracts clean enough for safe injection in the HPLC column. Silica and Florisol are frequently used to this end in the analysis of PAHs [21, 24]. Both sorbents were tested alone and in combination, also considering several different procedures for conditioning cartridges and eluting the analytes, some of which reduced the amount of co-extracted materials by as much as five times less than with the raw hexane extract (Table 1). Direct placement of sorbents in the extraction vessel was also tested, although no benefits were observed. Cleaner extracts, taking into account both the residue and the chromatographic profile, were obtained using both silica and Florisol cartridges in series, conditioned by dichloromethane and dichloromethane/hexane (1:1) and also eluted with dichloromethane/hexane (1:1). Typical chromatograms obtained with sludge under optimized conditions are shown in Fig. 2.

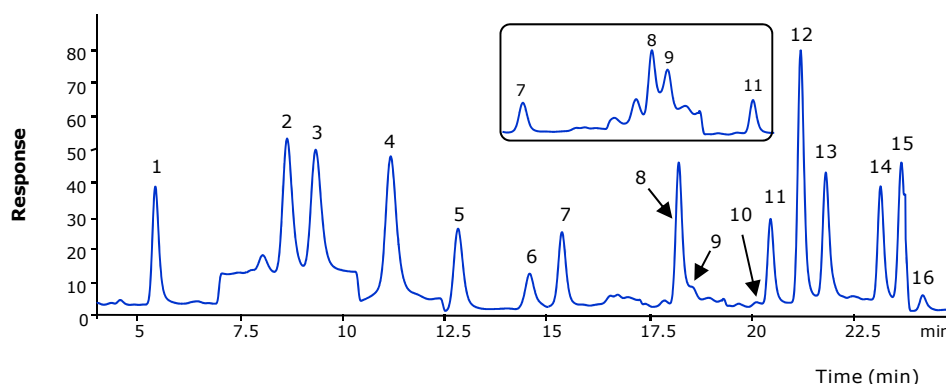


Fig. 2 Chromatograms obtained by fluorescence detection corresponding to a diluted 1:4 spiked sewage sludge extract (5 μL injected); inset a detail of wavelength selection for the quantification of Chry using 1:8 dilution. Peak assignment and spiked levels (ng g^{-1}): 1 Naph (22.6), 2 Ace (1.4), 3 Fluo (66.3), 4 Phen (132.7), 5 Anth (33.2), 6 Flt (265.4), 7 Pyr (265.4), 8 B[a]A (66.3), 9 Chry (33.2), 10 B[e]P (132.7), 11 B[b]F (265.4), 12 B[k]F (66.3), 13 B[a]P (132.7), 14 DB[ah]A (66.3), 15 B[ghi]P (66.3), 16 I[1,2,3-cd]P (132.7).

3.2. Performance of the analytical procedure

One of the least convenient aspects of the protocol developed was the evaporation of the sample extracts before and after clean-up. Significant losses of PAHs, especially the more volatile ones, may be anticipated during these stages. Thus, the loss of PAHs during the evaporation process was evaluated by subjecting 2-mL solutions of hexane spiked with the 16 PAHs at concentrations ranging between 10 and 100 ng mL^{-1} , to the whole clean-up procedure. The recoveries of spiked compounds are reported in Table 2. For the less volatile compounds (from B[a]A to I[1,2,3-cd]P; see Table 2), losses were less than 10%, although the losses were higher (15–32%) for the more volatile PAHs.

Table 2 Recoveries and RSDs obtained for the analytes considered, after submitting standard solutions including all of the compounds to the evaporation and solvent exchange processes included in the proposed protocol.

Compound	Recovery (%)	RSD (%) (n=4)
Naph	68.3	0.15
Ace	68.2	0.22
Fluo	68.6	0.04
Phen	71.4	0.11
Anth	86.1	0.13
Flt	82.0	0.56
Pyr	86.0	0.50
B[a]A	95.7	0.17
Chry	93.7	0.15
B[e]P	92.9	0.85
B[b]F	91.7	0.26
B[k]F	98.7	0.07
B[a]P	95.7	0.12
DB[a,h]A	96.5	0.10
B[ghi]P	97.2	0.78
I[123-cd]P	91.7	0.77

Recoveries from samples were evaluated by processing sludge samples spiked with standard solutions in acetonitrile at concentrations ca. 0.5, 1, 1.5 and 2 times the actual concentrations in original samples. Recoveries for the overall analytical process were calculated from the slope of the addition graph, appearing in the 60-100% range for the different analytes, with relative standard deviations lower than 5% (see Table 3). Notice that losses of PAHs reported in Tables 2 and 3 were very similar, suggesting that the extraction process is highly efficient (90-100%), with losses mainly attributable to the evaporation stages in the clean-up procedure. Although the reproducibility of evaporation losses allows compensation of recoveries, the use of alternative chromatographic techniques may eventually overcome these problems, thus enhancing overall recoveries and significantly reducing the time required for completion of the cycle. This possibility is currently being investigated.

Table 3 Reproducibility of the analysis of a sludge sample and recoveries for the whole analytical procedure applied to a real sample.

Compound	Sewage sludge material				Contaminated agricultural soil material			
	($\mu\text{g g}^{-1}$ d.m.)	RSD (%) (n=5)	Recovery (%) (Slope x 100)	RSD (%) (Slope error x 100)	($\mu\text{g g}^{-1}$ d.m.)	RSD (%) (n=5)	Recovery (%) (Slope x 100)	RSD (%) (Slope error x 100)
Naph	0.09	4.6	59.5	1.2	0.2	0.2	68.0	1.4
Ace	0.005	6.0	64.1	1.3	0.02	0.4	68.3	0.2
Fluo	0.2	1.4	62.7	1.2	0.03	0.4	63.2	1.2
Phen	1.0	1.0	70.1	2.0	0.1	0.2	76.4	1.1
Anth	0.08	0.7	84.8	1.8	0.01	0.1	82.2	1.3
Flt	1.8	1.9	79.4	3.2	0.09	0.3	89.0	1.3
Pyr	1.5	0.8	84.4	2.1	0.1	0.3	95.2	1.7
B[a]A	0.4	0.1	94.0	1.2	0.02	0.5	98.2	2.5
Chry	1.3	1.1	91.5	1.9	0.03	0.7	96.7	1.5
B[e]P	1.1	5.7	93.0	3.7	0.03	4.7	99.3	1.5
B[b]F	0.7	0.4	90.7	2.4	0.04	0.1	98.8	0.5
B[k]F	0.3	4.3	99.8	3.8	0.01	0.8	94.6	0.7
B[a]P	0.5	1.5	94.7	1.2	0.03	2.1	97.4	2.3
DB[a,h]A	0.2	1.5	95.5	2.7	0.005	2.7	95.9	1.9
B[g,h,i]P	0.5	2.7	97.9	4.4	0.02	2.1	92.7	2.6
I[1,2,3-cd]P	0.4	3.3	90.5	1.7	0.04	2.0	94.6	1.0

Reproducibility was assessed by a series of five independent experiments carried out on different days with the same sewage sludge material. Average concentrations (on a dry mass basis) and between-day precision are shown in Table 3.

Calibration curves were constructed at five levels, with each concentration being injected twice. The range of concentrations and other calibration data, as well as the detection (LOD, $S/N=3$) and quantification (LOQ, $S/N=10$) limits are summarized in Table 4. All the analytes can be quantified at levels well below the most restrictive limits imposed by the USA regulations [11] for B[a]P (1 mg kg^{-1} dm), and also below the limits imposed by the EU, and by French and Swedish governments.

Table 4 Regression analysis, LODs, and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	Calibration range (ng mL ⁻¹)	Calibration equation	Slope standard error	Intercept standard error	Correlation coefficient	LOD S/N=3 (µg g ⁻¹) ^a	LOQ S/N=10 (µg g ⁻¹) ^a
Naph	1-200	y=15.761x-1.5344	0.06	5.74	0.9999	0.0003	0.001
Ace	1-200	y=18.801x+6.9311	0.09	8.37	0.9999	0.004	0.01
Fluo	0.2-40	y=95.841x-6.131	0.18	3.46	0.9999	0.0007	0.002
Phen	0.1-20	y=63.026x+6.7125	0.30	2.79	0.9999	0.0001	0.0004
Anth	0.1-20	y=84.865x-0.7977	0.22	2.11	0.9999	0.0001	0.0004
Flt	0.2-40	y=9.5749x-1.559	0.04	0.74	0.9999	0.002	0.005
Pyr	0.1-20	y=27.667x-3.5753	0.17	1.62	0.9998	0.0007	0.002
B[a]A	0.1-20	y=77.251x-1.9018	0.34	3.22	0.9999	0.0001	0.0002
Chry	0.1-20	y=61.063x-6.7078	0.19	1.80	0.9999	0.0009	0.003
B[e]P	0.2-40	y=4.7651x+0.2987	0.04	0.78	0.9996	0.004	0.01
B[b]F	0.2-40	y=26.978x-2.1672	0.15	2.82	0.9998	0.001	0.004
B[k]F	0.1-20	y=158.83x+0.3825	0.89	8.36	0.9998	0.0002	0.0007
B[a]P	0.1-20	y=84.349x-13.355	0.42	3.94	0.9999	0.0004	0.002
DB[a,h]A	0.2-40	y=37.274x-3.5339	0.17	3.14	0.9999	0.0007	0.002
B[g,h,i]P	0.2-40	y=61.834x-20.395	0.43	8.08	0.9998	0.0008	0.003
I[1,2,3-cd]P	0.1-20	y=9.3376x-1.6638	0.05	0.50	0.9998	0.001	0.003

^a Concentration on dry weight basis

Furthermore, to check the performance of the whole analytical procedure, five samples (each 0.2 g) of BCR 088 sewage sludge reference material were processed according to the procedures described for extraction and clean-up. This material has certified concentrations for only seven of the considered PAHs. There was good agreement between the values obtained and the certified values (see Table 5 for mean concentrations and confidence intervals). The measurements corrected for recoveries provided further confirmation of the evaporative losses effect shown in Tables 2 and 3. BCR 088 CRM is certified above the homogeneity level of 1 g. As the proposed procedure applied to 0.2 g samples, additional confirmation was carried out by processing 1.0-g portions of the CRM and diluting the final extracts accordingly. The results were consistent with those summarized in Table 5, further confirming the robustness of the analytical process and also

suggesting that this CRM material can be used under the 1.0-g homogeneity level. A typical chromatogram corresponding to the BCR 088 material is shown in Fig. 3a.

Table 5 Measured concentrations and confidence intervals compared with certified concentrations for BCR 088 and BCR 524 reference materials.

Compound	BCR 088		BCR 524	
	Certified ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g g}^{-1}$) $\bar{X} \pm 2SD$ [\bar{X}_{corr}]* (n=5)	Certified ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g g}^{-1}$) $\bar{X} \pm 2SD$ [\bar{X}_{corr}]* (n=5)
Pyr	2.16 \pm 0.087	1.86 \pm 0.002 [2.20]	173 \pm 11	151.8 \pm 0.10 [179.9]
B[a]A	0.93 \pm 0.093	0.93 \pm 0.004 [0.99]	22.5 \pm 1.8	21.6 \pm 0.10 [23.0]
B[e]P	1.02 \pm 0.072	1.08 \pm 0.044 [1.16]	10.6 \pm 1.4	10.7 \pm 0.60 [11.5]
B[b]F	1.17 \pm 0.082	1.09 \pm 0.002 [1.20]	13.5 \pm 1.6	13.5 \pm 0.60 [14.9]
B[k]F	0.57 \pm 0.052	0.51 \pm 0.004 [0.51]	6.2 \pm 0.6	6.4 \pm 0.05 [6.4]
B[a]P	0.91 \pm 0.091	0.85 \pm 0.008 [0.90]	8.6 \pm 0.5	8.5 \pm 0.04 [9.0]
I[1,2,3-cd]P	0.81 \pm 0.057	0.73 \pm 0.018 [0.81]	5.1 \pm 0.4	4.8 \pm 0.08 [5.3]

* Values in brackets correspond to average values corrected for the calculated recoveries shown in Table 3.

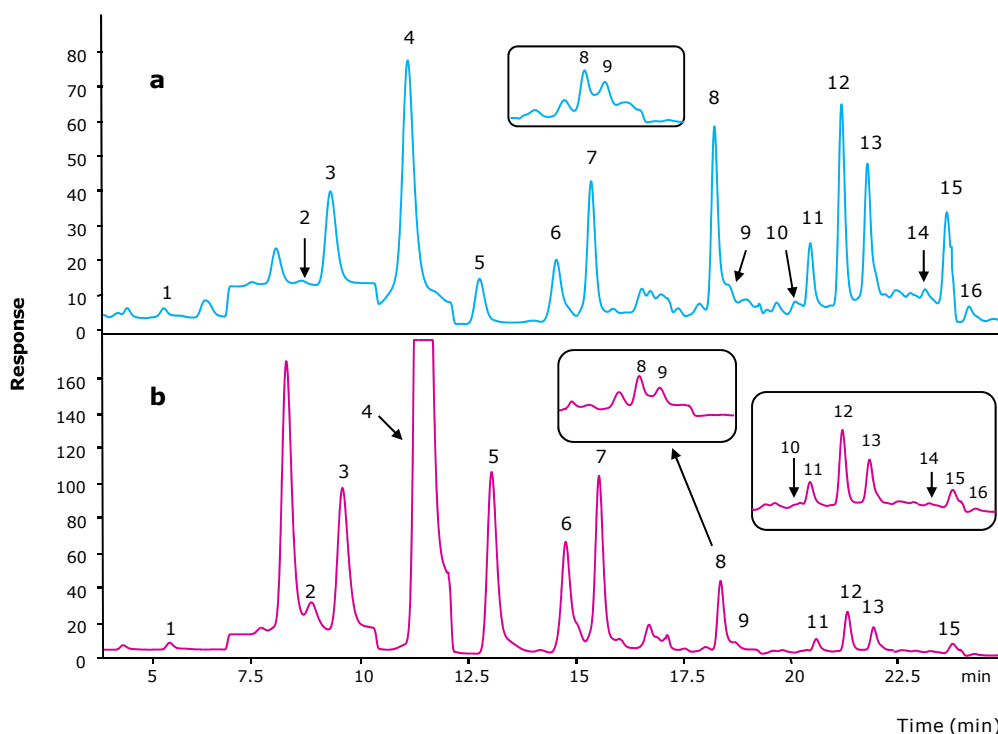


Fig. 3 Chromatograms obtained by fluorescence detection and corresponding to extracts of **a)** BCR 088 (1:2 diluted, 10 μ L injected) and **b)** BCR 524 (diluted 1:70 (v/v), 20 μ L injected). Peak assignments as in Fig. 2. Insets show details of wavelength selection for quantifying the indicated peaks.

3.3. Application to contaminated soils

Sewage sludge was considered in the procedure development because of challenging complexity. Once it was demonstrated that the optimized MAE procedure was suitable for extracting PAHs from sewage sludge samples, in terms of reproducibility and recovery, as well as time involved and solvent consumption, the analysis of soils as an extension of its application was undertaken. Both industrial and agricultural soils are candidates for this application because one of the main uses for sewage sludge is in amending agricultural soil. To verify the applicability of the method for extracting PAHs from industrial soils, a CRM (BCR 524, industrial contaminated soil) was used. The results obtained with this soil material are shown in Fig. 3b and indicate the suitability of the procedure for this types of samples, without any modification. The presence of the compounds indicated (Fig. 3b) was confirmed by UV/Vis spectroscopy. Five independent

extractions and analyses of the certified reference material were carried out. The mean concentrations obtained (considering dry mass) with confidence intervals were compared with certified concentrations for each PAH and the corresponding expanded uncertainty (Table 5). The concentrations obtained were consistent with the certified values.

Regarding the agricultural soil material, this sample was taken from a region importantly affected by forest fires in recent years. As expected, this material exhibits appreciable amounts of analytes (Table 3) albeit well below the limits recommended in the USA and EU. This material was spiked and recoveries evaluated. These data appear fully consistent with those obtained for the more complex industrial soil and sewage sludge materials, thus demonstrating the reliability and practical applicability of the developed procedure.

4. CONCLUSIONS

The developed procedure allows rapid and efficient extraction of the 16 PAHs considered from sewage sludge and soil samples, by simultaneous saponification of sample matrix interferences and extraction of analytes in hexane. Further clean-up of extracts with silica and Florisil cartridges in series provided extracts that were clean enough to be analyzed by HPLC with fluorimetric detection. Appreciable losses of the more volatile analytes appeared during the solvent exchanging process. Despite this drawback, the proposed procedure provided good recoveries and satisfactory reproducibility, allowing quantification of all the PAHs considered at levels well below the current internationally recognized limits. The wide applicability of the procedure was verified by considering sample materials of different complexity (sewage sludge, industrial and agricultural contaminated soils).

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project BQU2003-02090), E.U. FEDER funding and the Xunta de Galicia (project PGIDIT04PXIC23701PN).

REFERENCES

1. Harvey RG (1996) Polycyclic aromatic hydrocarbons. Wiley-VCH, New York.
2. Moffat CF, Whittle KJ (eds) (1999) Environmental contaminants in food. Sheffield Academic, Sheffield.
3. Rogers HR (1996) Sci Total Environ 185: 3-26.
4. Ferrari MD (1996) Rev Arg Microbiol 28: 83-98.
5. Bomboi MT, Hernandez A (1991) Water Res 25: 557-565.
6. Kirk PWW, Lester JN (1991) Environ Technol 12: 13-20.
7. Manoli E, Samara C (1996) Chromatographia 43: 135-42.
8. Bodzek D, Janoszka B, Dobosz C, Warzecha L, Bodzek M (1997) J Chromatogr A 774: 177-192.
9. Moreda JM, Arranz A, Fdez De Betono S, Cid A, Arranz JF (1998) Sci Total Environ 220: 33-43.
10. Harms HH (1996) Sci Total Environ 185: 83-92.
11. Villar P, Callejón M, Alonso E, Jiménez JC, Guiraúm A (2006) Chemosphere 64: 535-541.
12. Alcock RE, Jones KC (1993) Chemosphere 26: 2199-2207.
13. Council of the European Community, 27 April 2000. Working document on Sludge, 3rd Draft, Brussels.
14. Journal officiel de la République Française (1998) 1563. *Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boeufs sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées.*
15. Langenkamp H, Part P, Erhardt W, Prëß.A (2001) Organic contaminants in sewage sludge for agricultural use. European Commission, JRC-IESSWU.

16. Lopez-Avila V, Young R, Benedicto J, Ho P, Kim R, Becket WF (1995) *Anal Chem* 67: 2096-2102.
17. Noordkamp ER, Grotenhuis JTC, Rulkens WH (1997) *Chemosphere* 35: 1917-1907.
18. Hawthorne SB, Grabanski CB, Martin E, Miller DJ (2000) *J Chromatogr A* 892: 421-433.
19. Yuen Shu Y, Long Lai T, Lin H, Yang TC, Chang C (2003) *Chemosphere* 52: 1667-1676.
20. Villar P, Callejón M, Alonso E, Jiménez JC, Guiraúm A (2004) *Anal Chim Acta* 524: 295-304.
21. Miège C, Dugay J, Hennion MC (2003) *J Chromatogr A* 995: 87-97.
22. Flotron V, Houessou J, Bosio A, Delteil C, Bermond A, Camel V (2003) *J Chromatogr A* 999: 175-184.
23. Letellier M, Budzinski H, Bellocq J, Connan J (1999) *Org Geochem* 30: 1353-1365.
24. Bangkedphol S, Sakultantimetha A, Keenan H, Songsasen A (2006) *J Environ Sci Health* 41: 1105-1116.
25. Codina G, Vaquero MT, Comellas L, Broto-Puig F (1994) *J Chromatogr A* 673: 21-29.
26. Northcott GL, Jones KC (2001) *Environ Sci Technol* 35: 1103-1110.
27. Eschenbach A, Kästner M, Biert R, Shaefer G, Mahro B (1994) *Chemosphere* 28: 683-692.
28. Oleszczuk P, Baran S (2004) *J Hazard Mater B* 113: 237-245.
29. Manirakiza P, Covaci A, Schepens P (2001) *J Food Comp Anal* 14: 93-100.
26. Pena T, Pensado L, Casais C, Mejuto C, Phan-Tan-Luu R, Cela R (2006) *J Chromatogr A* 1121: 163-169.

**1.2.3. OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN
DE MUESTRA BASADO EN LA DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE
SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN SUELO**

Publicación III

**OPTIMIZATION OF THE MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION
SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR ANALYSIS OF POLYCYCLIC
AROMATIC HYDROCARBONS IN SOILS: COMPARISON WITH
MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION**

J. Chromatogr. A 1165 (2007) 32

Doi:10.1016/j.chroma.2007.08.007

OPTIMIZATION OF THE MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION SAMPLE PREPARATION PROCEDURE FOR ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOILS: COMPARISON WITH MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION

M. T. Pena, M. C. Casais, M. C. Mejuto, R. Cela

Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain.

Abstract

A fast and simple preparation procedure based on the matrix solid-phase dispersion (MSPD) technique is proposed for the first time for the isolation of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from soil samples. Naphthalene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[e]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, dibenzo[a,h]anthracene, benzo[g,h,i]perylene, and indeno[1,2,3-c,d]pyrene were considered in the study. Extraction and clean-up of samples were carried out in a single step. The main parameters that affect extraction yield, such as dispersant, type and amount of additives, clean-up co-sorbent and extractive solvent were evaluated and optimized. The addition of an alkali solution in MSPD was required to provide quantitative recoveries. Analytical determinations were carried out by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection. Quantification limits (between 0.01 and 0.6 ng g⁻¹ dry mass) were well below the regulatory limits for all the compounds considered. The extraction yields for the different compounds obtained by MSPD were compared with the yields obtained by microwave-assisted extraction (MAE). To test the accuracy of the MSPD technique, the optimized methodology was applied to the analysis of standard reference material BCR-524 (contaminated industrial soil), with excellent results.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Matrix solid-phase dispersion; Microwave-assisted extraction; Soil analysis.

1. INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) comprise a group of ubiquitous environmental contaminants that originate from different emission sources, mainly associated with human activities, such as the incomplete combustion of fossil fuels, industrial processes or the use of motor vehicles. Since these pollutants exert toxic, mutagenic and carcinogenic effects, knowledge of their fate in soils is critical in hazard risk assessment [1,2].

PAHs are strongly adsorbed onto the organic fraction of sediments and soils. These compounds are mainly accumulated in the humus layer of soil, and PAHs with three or more rings tend to be strongly adsorbed. Strong sorption coupled with very low water solubility and low vapour pressures make leaching and volatilization insignificant in PAH dissipation [3].

The Spanish government has established regulatory levels for some PAHs in terms of soil uses. Maximum acceptable limits for 13 PAHs, namely: naphthalene (Naph, 1 mg kg⁻¹ dm (dry mass basis)), acenaphthene (Ace, 6 mg kg⁻¹ dm), fluorene (Flu, 5 mg kg⁻¹ dm), anthracene (Anth, 45 mg kg⁻¹ dm), fluoranthene (Flt, 8 mg kg⁻¹ dm), pyrene (Pyr, 6 mg kg⁻¹ dm), benz[a]anthracene (B[a]A, 0,2 mg kg⁻¹ dm), chrysene (Chry, 20 mg kg⁻¹ dm), benzo[b]fluoranthene (B[b]F, 0,2 mg kg⁻¹ dm), benzo[k]fluoranthene (B[k]F, 2 mg kg⁻¹ dm), benzo[a]pyrene (B[a]P, 0,02 mg kg⁻¹ dm), dibenzo[a,h]anthracene (DB[a,h]A, 0,03 mg kg⁻¹ dm) and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (I[1,2,3-c,d]P, 0,3 mg kg⁻¹ dm), have been established in soils destined for agricultural, forest and/or cattle activities [4]. The Spanish regulations are risk-oriented, in line with the European Union chemicals policy. Obviously, some aspects of the regulations are specifically tailored to the Spanish situation, such as the distribution of powers between the national and regional governments. However, a significant part of the approach is based on the European risk assessment protocols, and therefore, can be extrapolated at the pan-European level [5].

The analytical determination of organic pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons, in soils and sediments usually involves extensive and complex methods of sample preparation, mainly because of the difficulty in achieving a selective and quantitative leaching of the analytes from the solid sample.

Soxhlet extraction is considered as the standard method for leaching PAHs from solids, although it requires long extraction times and large volumes of organic solvents [6]. Alternatives include pressurized liquid extraction (PLE; Dionex trade name ASE for accelerated solvent extraction) [7,8] and supercritical fluid extraction (SFE) [9,10]. Although the extraction times in both PLE and SFE are short (ca. 10 min), the methods require dedicated and expensive apparatus. Other alternatives include ultrasonic-assisted extraction (USE), which is a simple and rapid method but with limited extraction efficiency [11,12], and microwave-assisted extraction (MAE) [13,14].

It has also been shown that hydrolytic treatment of soil organic matter (e.g., with methanolic potassium hydroxide) releases significant quantities of non-solvent leachable organic contaminants, which are strongly associated with and/or occluded within the soil organic matter. The release of compounds can occur in two ways. Firstly, hydrolysis of organic matter splits labile ester bonds, which results in a limited break-down of the macromolecular humic network and improves solvent accessibility. Organic compounds that are bound to the soil organic matter by hydrolysable bonds will be released under these conditions. Secondly, the introduction of alkaline conditions causes an extension of the humic macromolecular polymeric structure as a result of mutual repulsion among negatively charged carboxyl, phenolic and hydroxyl functional groups. This provides improved accessibility within the humic macromolecular structure, promoting the release of diffusion-retarded contaminant fractions, and reducing hydrogen bonding ability, all of which combine to promote release of compounds. As a result sorbed PAHs are more accessible to the solvent and can be extracted more efficiently [15,16].

Because of the unsurprising presence of interfering compounds in the extracts, due to the complexity of the soil matrix, samples require an intensive clean-up before they can be submitted to the determination steps, which are usually carried out by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) or liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD). Solid-phase extraction (SPE) is still the most commonly used method for purification of soil and sediment extracts. A large number of sorbents are used for the isolation of organic compounds from the extract solution, including alumina, Florisil®, silica gel and

many silica-based sorbents (e.g., octadecyl bonded silica (C_{18}), octyl bonded silica (C_8)) [17].

These methods are generally tedious and costly, especially when many samples must be analysed (e.g., during soil remediation projects), and a rapid and simple method is desirable. MSPD has proven to be a fast and efficient alternative to traditional extraction methods. The technique, which is based on simultaneous disruption and extraction of solid and semi-solid samples, permits complete fractionation of the sample matrix components as well as selective elution of single compounds or several classes of compounds from the same sample. The sample disperses over the surface of the bonded phase support material to provide a new mixed phase for isolating analytes from various sample matrices. Less solvent and less time are generally required than in classic methods [18,19]. The method has been most frequently applied to the isolation of drugs, herbicides, pesticides and other pollutants from animal tissues, fruits and vegetables [20,21], including isolation of PAHs from fish samples [22], honey samples [23], animal diets [24] and tissues of aquatic species [25]. However, some methods have also been successfully developed for the determination of persistent organic pollutants in other matrices such as soils, sediments, freeze-dried sludge from sewage treatment plants and indoor dust [26-28].

The aim of the present study was to optimise and validate the MSPD method, for the extraction of 16 PAHs (Naph, Ace, Flu, phenanthrene (Phe), Anth, Flt, Pyr, B[a]A, Chry, benzo[e]pyrene (B[e]P), B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,h]A, benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) and I[1,2,3-c,d]P) from soil samples. The effect of the addition of different amounts of methanolic potassium hydroxide on the extraction process was also evaluated, and the effects on the extraction of the use of different types of organic solvents and sorbents (for dispersal and as co-column) were studied. The results obtained with MSPD were compared with those obtained with the microwave-assisted extraction based method [13], and the analytical method was validated with BCR-524 (contaminated industrial soil) reference material.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents, standards and materials

Polypropylene SPE syringe barrels (15 mL capacity) fitted with a single bottom frit and additional 20 μm polyethylene frits were obtained from International Sorbent Technology (Mid Glamorgan, UK).

HPLC chromatographic separations were developed in a system comprising a 600E pump with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA), UV/Visible diode array and fluorescence detectors in series (HP Series 1100, Agilent, Waldbrom, Germany). The injector (Rheodyne Model 7725i, Cotati, CA, USA) was fitted with a 20 μL loop. Analytical column temperatures were controlled with a MetaTherm 9540 oven (MetaChem, Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 4.6 mm I.D. Waters PAH C_{18} column, (particle size 5 μm). A Waters guard-pak, with Nova-Pak C_{18} inserts, was used to protect the analytical column (both purchased from Waters). Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]) was used for data acquisition.

Elemental analyses were carried out in shared research facilities at the University of Santiago de Compostela.

A Unicen (Orto-Alresa, Madrid, Spain) centrifuge was used to centrifuge the raw sample extracts. Solvent evaporation was carried out with a Turbo Vap II automated nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA).

Acetonitrile and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), n-hexane, acetone and dichloromethane (Suprasolv), were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford MA, USA). EPA-610 Polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and B[e]P (solid, 98.5%) were supplied by Supelco (Bellefonte PA, USA). Potassium hydroxide (Pellets, >85%, AC), Florisil® (60-100 mesh) and octyldecyl-functionalized silica gel (70-230 mesh, 9-12% carbon loading) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and silica gel (230-400 mesh) was obtained from Merck. For some experiments the normal-phase materials were activated at 105 $^{\circ}\text{C}$ for 48 h and then allowed to cool down in a desiccator before being used in the MSPD cartridge. Anhydrous sodium sulphate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain).

Standard reference material BCR 524 was supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium).

Durapore filters (Millex GV, 13 mm, 0.22 μm) were supplied by Millipore. Silica (Sep-Pak, 500 mg) and Florisil[®] (Sep-Pak, 900 mg) cartridges were obtained from Waters.

Microwave-assisted extractions (MAE) were performed with an Ethos E-320 (1000 W) Microwave Extraction System (Milestone, Leutleirch, Germany) equipped with 12 vessels, each of nominal volume 100 mL. The maximum values of temperature and pressure inside the extraction vessels were 260 °C and 35 bar (500 psi).

2.2. Samples

A sample of contaminated agricultural soil was collected at Louro (Galicia, northwest Spain) a region seriously affected by forest fires in 2006 and previous years. Appreciable levels of some of the analytes were therefore anticipated. The reference material, BCR 524, is dried contaminated industrial soil. The humidity of the materials (2.03% for the agricultural soil and 2.7% for BCR 524, all expressed on a dry mass basis) was evaluated gravimetrically, after drying sample portions of materials in an oven at 105 °C for 2h. The total carbon, nitrogen, and sulphur contents of the materials were 2.74%, 0.10% and 0.00% respectively, for the agricultural soil material, and 11.9%, 0.17%, and 0.06% for BCR 524.

A spiked sample was prepared by adding a standard solution of analytes in acetonitrile. Soil sample was spiked with PAHs at levels between 5 and 150 ng g⁻¹. The spiking procedure consisted of mixing, 500 g of soil with 250 mL of a standard solution of sixteen PAHs in acetonitrile. The mixture was mechanically stirred and allowed to air dry at room temperature for 24 h with occasional mixing. This procedure was carried out 7 months before sample analysis and all spiked and non-spiked soil samples were then lyophilized and sieved.

Different particle-size fractions (1000–300 μm , 300–60 μm , less than 60 μm) were stored separately before analysis. All fractions were analysed according to the previously developed and optimized MAE method [13]. As expected, the results showed that PAHs accumulate preferentially with decreasing particle size,

and are consistent with previously reported results [29]. The <300 µm particle size fraction was considered in the study. Sieved samples were stored in amber glasses at 4 °C.

3. SAMPLE PREPARATION

3.1. MSPD procedure

Silica and Florisil® contain appreciable traces of PAHs and consequently require some washing before application of MSPD. Sorbents were pre-washed in columns with a hexane-acetone (1:1, v/v) mixture and stored dry before use. Polypropylene SPE syringe barrels and polyethylene frits were also sonicated with acetone and hexane-acetone (1:1) in two steps, each of 15 min and were stored in clean bags to provide reproducible blanks.

Under the finally optimized conditions, 0.5 g (weighed accurately) of lyophilized soil sample was first soaked in 500 µL of saturated methanolic potassium hydroxide solution in a glass mortar, then 1 g of Florisil® was added and the mixture was thoroughly blended with the pestle for 1 min. A syringe barrel containing a frit at the bottom was previously filled (from bottom to top) with a layer of 0.5 g of Florisil® and then another layer of 0.5 g of silica. These materials act as co-column or clean-up phases in the cartridge elution. Finally, the blend was loaded in a cartridge and a second frit was placed over the dispersed sample with slight compression.

The analytes were eluted from the cartridges with 6 mL of hexane-acetone (1:1). The eluate was then evaporated to 0.5 mL under a stream of nitrogen in the Turbo Vap. One millilitre of acetonitrile (ACN) was added and the mixture again concentrated to 0.5 mL. The final concentrated extract was then transferred to a 1 mL volumetric flask and the volume made up to the mark with water. The extract was filtered through a 0.22 µm Durapore filter and injected into the HPLC system.

3.2. MAE procedure

The MAE procedure was used as reference method in the optimization of the MSPD procedure. Samples (0.5 g) of dried soil were analysed according to the previously reported saponification-extraction method for PAHs [13].

3.3. Chromatographic separation

Samples were eluted with the following binary solvent (acetonitrile-water) gradient programme: initial conditions, 47% ACN for 2 min, then a linear ramp to 90% ACN within 10 min and another linear ramp to 100% ACN within 3 min, and holding at 100% for 11 min. Column temperature was maintained at 35 °C and mobile phase flow rate was 1.2 mL min⁻¹. Detection including fluorescence wavelength programming was used for better sensitivity and minimal interference [13]. The excitation and emission wavelengths were changed according to the elution time of each PAH.

4. RESULTS AND DISCUSSION

4.1. Optimization of conditions for matrix solid-phase dispersion

4.1.1. Effect of solid sorbents

Preliminary experiments were carried out to assess the effect of several sorbents on the yield and selectivity of the MSPD process. In these experiments, acetonitrile (25 mL) was selected as the eluting solvent, because it had previously been used for the extraction of PAHs from complex matrices [22].

The first step in the method setup was the evaluation of a suitable sample matrix:solid support ratio to allow complete adsorption of the soil components and to facilitate the transfer into the cartridge. Sample/sorbent ratios typically range from 1:1 to 1:4 [20]. Florisil and C₁₈ were sorbents used in this study and ratios of 1:4 (0.5 g sample to 2 g of solid sorbent) and 1:2 (0.5 g sample to 1 g of solid sorbent) were evaluated. A ratio of 1:2 (sample:solid sorbent) was shown to be satisfactory, whereas large volumes of solvent were needed to remove analytes from the cartridge with a sample:sorbent ratio of 1:4.

It has been suggested that the duration of grinding has little or no effect [18]. However, two times of blending (1 and 5 min) were tested. The results showed that increasing the dispersal time did not enhance the extraction. On the contrary, lower extraction efficiencies were observed when the dispersal time was 5 min. A grinding time of 1 min was therefore chosen for all subsequent experiments.

The selectivity of the MSPD procedure depends on the sorbent/solvent combination used. Most methods reported to date use reversed-phase material, such as C_8 and C_{18} as the solid support. The lipophilic character of reversed-phase materials is believed to facilitate disruption, dispersal and retention of lipophilic entities [18]. For analyte extraction from animal tissues, C_{18} is by far the most popular sorbent. For plant samples, both C_8 and C_{18} and Florisil® are used extensively. Semi-solid samples are mostly dispersed on Florisil® or C_{18} [20].

Several sorbents (silica, C_{18} and Florisil®) were assayed as dispersant and co-column to provide sample extracts clean enough for safe injection in the HPLC system. Samples (0.5 g soil) were dispersed with 1 g of one of the sorbents. In some cases, a small amount of solvent or solution was added to soak the sample. Methanol and saturated methanolic potassium hydroxide solution were evaluated in combination with Florisil® or silica as dispersants, hexane-dichloromethane (1:1 v/v) and water with C_{18} . The mixtures were then transferred to polypropylene cartridges containing 1 g of sorbent or a combination of several sorbents. As already mentioned, acetonitrile was initially selected as the extraction solvent. The most significant results of this series of preliminary experiments are summarized in Table 1.

Table 1 Amount of residue in soil extracts and values of recovery of analytes obtained by different extraction procedures.

MSPD Conditions				Results	
Dispersant	Type of additive ^a	Co-column	Extraction solvent	Residue (mg g ⁻¹ sample) ^b	Recoveries ^c (%)
1 g Flo	-	0.5 g Sil+0.5 g Flo	25 mL ACN	1.0 ± 0.3	43
1 g C ₁₈	-	0.5 g Sil+0.5 g Flo		4.1 ± 0.5	67
1 g C ₁₈	200 µL water+0.5 g Na ₂ SO ₄ anhydrous	0.5 g Sil+0.5 g Flo		4 ± 1	54
1 g Flo ^d	500 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo ^d		2.3 ± 0.7	56
1 g Sil	750 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo		1.3 ± 0.3	45
1 g Flo	500 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Flo+0.5 g C ₁₈		3.3 ± 0.9	48
	500 µL methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo		13 ± 6	-
	500 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo		0.9 ± 0.2	60
	500 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo	2 mL Acetone	16 ± 2	94
	500 µL saturated KOH in methanol	0.5 g Sil+0.5 g Flo	6 mL hexane-acetone (1:1)	3.2 ± 0.1	99
	-	0.5 g Sil+0.5 g Flo		1.4 ± 0.2	60

Sample size: 0.5 g. Unspiked soil samples were eluted with acetonitrile. (-) not injected (very dirty extracts). ^a Amounts of solvent or solutions added in blending step. ^b Average of three determinations ± standard deviation. Flo: Florisil, Sil: Neutral silica. ^c Average of 16 PAHs recoveries as compared to MAE. ^d Activated sorbents.

C₁₈ provided recovery values similar to those obtained with Florisil® but higher levels residues were obtained (see Table 1). Moreover, this sorbent is not compatible with the use of saturated methanolic potassium hydroxide solution in the blending step. Addition of water or hexane-dichloromethane mixture did not improve the results of use of C₁₈ in terms of either recoveries or residues. Low residues and high recoveries were obtained with Florisil® when some alkali solution was added, while with methanol as additive, dark-coloured extracts were obtained. On the other hand silica in combination with alkaline solution produced lower recoveries and higher residues than Florisil®. Florisil® with potassium hydroxide solution was therefore preferred for MSPD because it provided the best performance in terms of recoveries and extract cleanness.

As regards the co-column, silica, Florisil® and C₁₈ were tested alone and in combination. Comparison of the data obtained revealed similar recovery values for 1 g silica, 1 g Florisil® alone or in combination (0.5 g silica (above) and 0.5 g Florisil® (below)), whereas lower residues were obtained with the combination of silica and Florisil®. A combination of C₁₈/ Florisil® was also tested, but the results demonstrated that the combination of silica and Florisil® was the most effective for removing interfering compounds, providing the best recoveries for all the target analytes and cleanest extracts. Furthermore, activation of these sorbents did not enhance either recoveries or extract cleanness. These observations are consistent with some previously reported results [17] and suggest that the deactivation of active sorbents (silica, alumina and Florisil®) improves the efficiency and reproducibility of SPE processes.

4.1.2. Effect of the solvent on extraction efficiency

Although acetonitrile was used systematically to elute the cartridges in all described experiments, the results obtained were much poorer than those obtained with the reference MAE procedure. Thus, in a second series of experiments, the extraction capability of several solvents was evaluated. The hexane-dichloromethane mixture (1:1) was tested as the extraction solvent because it had previously been used for the elution of PAHs in a SPE clean-up step with sewage sludge extracts [13], although without satisfactory results. Other experiments included dichloromethane, hexane, methanol, acetone and hexane-acetone (1:1). Dichloromethane provided low recoveries for all studied compounds, whereas

hexane provided good recoveries for lower molecular weight (mw) PAHs and low recoveries for higher mw PAHs (see Fig. 1). Methanol yielded unsuitable dark-coloured, alkaline extracts.

Acetone and the hexane-acetone mixture (1:1) proved to be the best mixture for effective removal of the analytes from the cartridge at low solvent volumes. Two millilitres of acetone or 6 mL of mixture hexane-acetone (1:1) were sufficient to elute the analytes from the cartridge. Thus, the weight of residues in extracts (see Table 1) was taken into account in choosing the most suitable solvent, and the mixture of hexane-acetone (1:1) was accordingly selected.

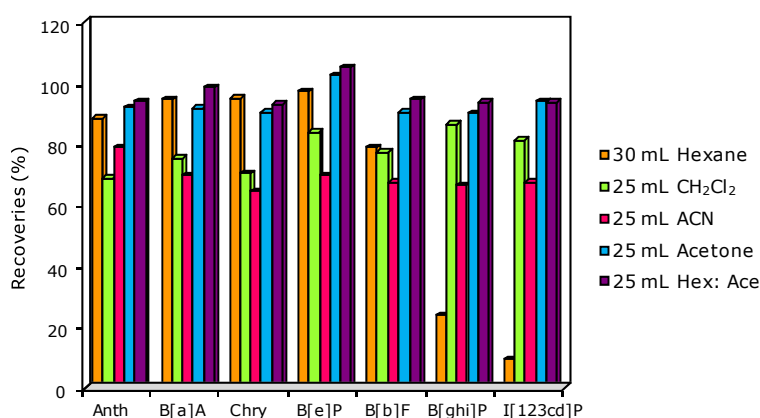


Fig. 1 Effect of extraction solvent on the recovery of some representative PAHs by MSPD extraction. Hex: n-hexane, CH₂Cl₂: dichloromethane, ACN: acetonitrile, Ace: acetone, Hex-Ace: hexane-acetone (1:1, v/v). Sample: spiked soil (concentrations obtained with the MAE procedure, see Fig. 3).

4.1.3. Effect of modifier addition

The final stage of optimization of the MSPD procedure consisted of evaluation of the effect of the amount of alkaline added when the samples were blended. Preliminary assays showed that this treatment was important in terms of minimising extract residues and maximising recoveries of PAHs. A series of experiments was carried out in which different amounts of alkali were added. For most of the analytes, recoveries were on average 30-50% lower (see Fig. 2) in the absence of alkaline treatment. As expected, recoveries increased as the amount of alkali increased, until a constant value was reached.

The overall results showed that the combined effect of Florisil® as solid-phase, 500 μL of saturated methanolic potassium hydroxide solution as additive, 0.5 g of Florisil® and 0.5 g of silica as clean-up layers and 6 mL of hexane-acetone (1:1, v/v) as elution solvent makes this extraction procedure suitable for determining 16 PAHs in a complex matrix such as soil. Typical chromatograms obtained with spiked soil under MSPD and MAE optimized conditions are shown in Fig. 3. Very similar chromatographic clean profiles were obtained with both MSPD and MAE procedures, thus confirming that the MSPD procedure can be used to produce soil extracts ready for further separation and analysis.

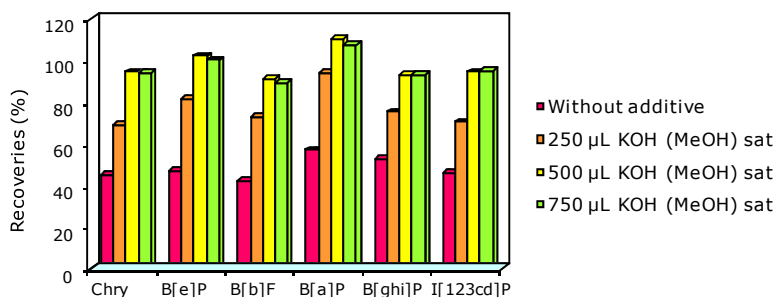


Fig. 2 Effect of the amount of saturated methanolic potassium hydroxide solution on the efficiency of the MSPD extraction for some representative PAHs. KOH (MeOH) sat: saturated methanolic potassium hydroxide solution. Sample: spiked soil (concentrations obtained with the MAE procedure, see Fig. 3).

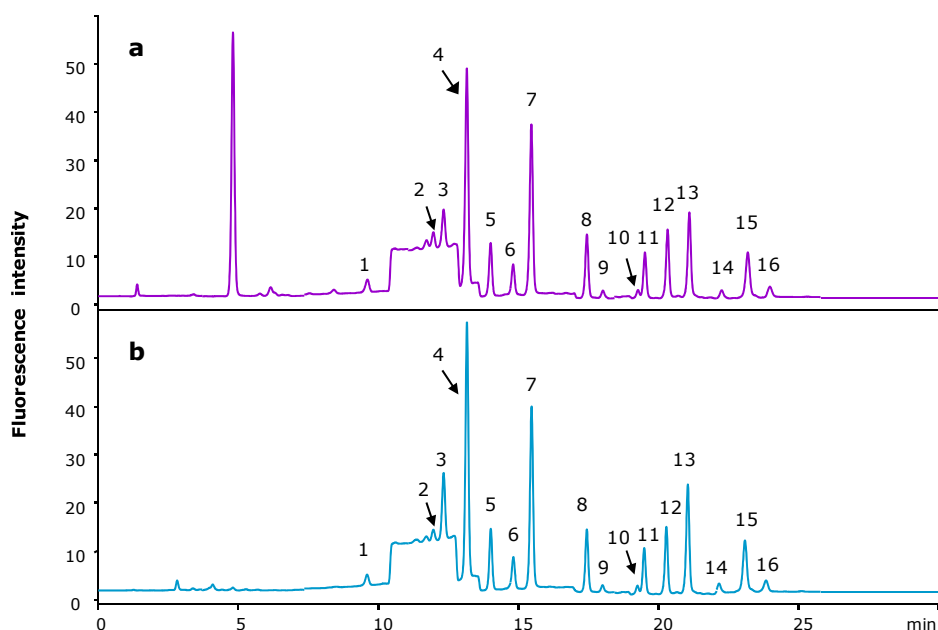


Fig. 3 Chromatograms obtained by fluorescence detection, and corresponding to (a) spiked soil extract obtained by MAE and (b) spiked soil (diluted 1:5) extract obtained by MSPD. Peak assignment: 1, Naph (39.07 ng g^{-1}); 2, Ace (38.96 ng g^{-1}); 3, Flu (21.54 ng g^{-1}); 4, Phen (138.88 ng g^{-1}); 5, Anth (26.38 ng g^{-1}); 6, Flt (153.95 ng g^{-1}); 7, Pyr (186.91 ng g^{-1}); 8, B[a]A (33.13 ng g^{-1}); 9, Chry (74.16 ng g^{-1}); 10, B[e]P (65.18 ng g^{-1}); 11, B[b]F (76.40 ng g^{-1}); 12, B[k]F (20.59 ng g^{-1}); 13, B[a]P (45.86 ng g^{-1}); 14, DB[a,h]A (10.10 ng g^{-1}); 15, B[g,h,i]P (47.47 ng g^{-1}); 16, I[1,2,3-cd]P (69.67 ng g^{-1}).

4.2. Performance of the analytical procedure

Calibration curves were prepared at five levels. Each calibration level was injected twice. The range of concentrations and other calibration figures of merit, as well as the detection (LOD, $s/n=3$) and quantification (LOQ, $s/n=10$) limits for the proposed method are summarized in Table 2. The results show that all the analytes were quantified far below the limit imposed by current regulations [4].

Table 2 Regression analysis, LODs and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	Calibration range (ng mL ⁻¹)	Calibration equation	Slope standard error	Intercept standard error	Correlation coefficient	LOD S/N=3 (ng g ⁻¹) ^a	LOQ S/N=10 (ng g ⁻¹) ^a
Naph	1-200	$y=6.1948x-1.9559$	0.01	1.3	0.9996	0.2	0.6
Ace	1-200	$y=7.1117x+0.2985$	0.03	3.2	0.9999	0.1	0.4
Flu	0.2-40	$y=30.859x+2.0327$	0.1	2.3	0.9999	0.03	0.08
Phen	0.1-20	$y=27.522x-1.8729$	0.08	0.8	0.9999	0.05	0.2
Anth	0.1-20	$y=34.767x-1.7347$	0.1	1.1	0.9999	0.02	0.07
Flt	0.2-40	$y=3.6434x-0.8683$	0.01	0.3	0.9999	0.1	0.5
Pyr	0.1-20	$y=16.776x-0.9578$	0.08	0.8	0.9999	0.04	0.1
B[a]A	0.1-20	$y=32.068x-0.4474$	0.05	0.5	1	0.007	0.02
Chry	0.1-20	$y=1.7574x+0.0078$	0.007	0.07	0.9999	0.2	0.6
B[e]P	0.2-40	$y=2.1948x+0.2507$	0.006	0.1	0.9999	0.1	0.4
B[b]F	0.2-40	$y=10.349x+0.9212$	0.03	0.6	0.9999	0.02	0.07
B[k]F	0.1-20	$y=57.919x+2.4665$	0.1	1.2	0.9999	0.004	0.01
B[a]P	0.1-20	$y=34.237x-1.287$	0.09	0.9	0.9999	0.007	0.02
DB[a.h]A	0.2-40	$y=16.265x-1.2747$	0.07	1.5	0.9999	0.02	0.06
B[ghi]P	0.2-40	$y=23.456x-2.9172$	0.09	1.8	0.9999	0.02	0.05
I[123-cd]P	0.1-20	$y=3.5162x-0.1079$	0.02	0.2	0.9999	0.06	0.2

^a Concentration on dry weight basis.

Recoveries were evaluated by processing soil samples with standard additions at concentrations ca. 0.5, 1, 1.5, and 2 times the actual concentrations in original samples (Table 3). As previously reported [13], significant losses of some PAHs are produced during the solvent evaporation stages associated with sample preparation procedures. These losses were taken into consideration and recoveries for the overall analytical process were calculated from the slope of the addition graph. The extraction process was highly efficient, with recoveries higher than 94% and relative standards deviations lower than 2% (Table 4).

Table 3 Average concentrations and intermediate precision of the analysis of non-spiked soil samples.

Compound	MSPD		MAE	
	(ng g ⁻¹ dm)	S.D. (n=6)	(ng g ⁻¹ dm)	S.D. (n=5)
Naph	46.65	0.87	46.82	1.73
Ace	5.26	0.26	5.47	0.3
Flu	8.72	0.71	10.39	0.36
Phen	31.40	1.13	33.27	1.74
Anth	2.95	0.04	2.94	0.09
Flt	38.21	1.37	36.23	0.89
Pyr	27.31	0.30	26.34	2.08
B[a]A	9.85	1.01	7.29	0.44
Chry	27.24	0.49	27.35	1.76
B[e]P	18.03	0.24	17.97	0.95
B[b]F	23.21	0.82	21.28	1.72
B[k]F	8.17	0.10	8.02	0.66
B[a]P	13.94	0.06	9.43	0.82
DB[a,h]A	2.82	0.05	2.73	0.08
B[ghi]P	16.12	0.13	15.96	0.74
I[123-cd]P	17.67	0.24	17.33	0.47

Intermediate precision was assessed by a series of six independent experiments carried out on different days, with non-spiked soil. The MSPD and MAE techniques were compared for the same soil. Average concentrations (on a dry mass basis) and precision between days are reported in Table 4. The degree of precision obtained with MSPD was similar to that obtained with the MAE procedure and there was good agreement between MAE measurements and MSPD evaluated concentrations. Furthermore, to check the performance of the analytical procedure, six samples of BCR 524 industrial soil reference material were processed by the described procedure. There was good agreement between the values obtained and the certified values (see Table 5 for mean concentrations and confidence intervals).

Table 4 Recoveries and R.S.D.s for the extraction procedure applied to real soil samples.

Compound	Recovery (%) (slope x 100)	R.S.D. (%) (slope error x 100)
Naph	94.3	0.9
Ace	100.1	1.9
Flu	102.6	1.5
Phen	99.1	1.5
Anth	99.9	1.6
Flt	97.4	0.9
Pyr	97.2	1.5
B[a]A	103.9	1.4
Chry	99.9	0.2
B[e]P	101.3	0.5
B[b]F	100.9	1.8
B[k]F	98.7	1.7
B[a]P	97.6	1.2
DB[a,h]A	98.6	0.7
B[ghi]P	99.1	0.6
I[123-cd]P	101.0	1.9

Table 5 Measured concentrations and confidence intervals compared with certified concentrations for BCR 524 reference material.

Compound	BCR 524	MSPD	MAE [13]
	Certified ($\mu\text{g g}^{-1}$)		Measured ($\mu\text{g g}^{-1}$)
		$\bar{X} \pm 2\text{S.D. (n=6)}$	$\bar{X} \pm 2\text{S.D. (n=5)}$
Pyr	173 \pm 11	182 \pm 5	179.9 \pm 0.1
B[a]A	22.5 \pm 1.8	22.6 \pm 0.7	23.0 \pm 0.1
B[e]P	10.6 \pm 1.4	11.8 \pm 0.4	11.5 \pm 0.6
B[b]F	13.5 \pm 1.6	14.9 \pm 0.5	14.9 \pm 0.6
B[k]F	6.2 \pm 0.6	6.6 \pm 0.3	6.4 \pm 0.05
B[a]P	8.6 \pm 0.5	9.0 \pm 0.1	9.0 \pm 0.04
I[123-cd]P	5.1 \pm 0.4	5.3 \pm 0.1	5.3 \pm 0.1

5. CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, the proposed procedure constitutes the first application of the MSPD technique to the determination of PAHs in soil samples. The method allows extraction and clean-up to be carried out in a single step, without additional purification of extracts. Extraction conditions were carefully selected to achieve maximal recovery of the PAHs contained in soil samples while eliminating most of the interfering matrix components.

The results demonstrate that the accuracy, precision and selectivity of the proposed method are satisfactory for analysis of PAHs. Quantification limits achieved by the method allow the application of the procedure below the levels imposed by existing regulations. The method requires a small sample size and offers considerable savings in terms of solvent consumption, cost of materials, sample manipulation and time involved.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project CTQ2006-03334/BQU), E.U. FEDER funding and the Xunta de Galicia (project PGIDIT06PXIB237039PR).

REFERENCES

- [1] Polynuclear aromatic compounds, Part 1. Chemicals, Environmental and Experimental Data, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 32, IARC, Lyon, 1983.
- [2] D. Mackay, W.Y. Shiu, K.C. Ma, Illustrated Handbook of Physical-Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals, in: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Polychlorinated Dioxins and Dibenzofurans, vol II, Lewis Publishers, Boca Raton, 1992.
- [3] K.S. Park, R.S. Sims, R.R. Dupont, W.J. Doucette, J.E. Mathews, Environ. Toxicol. Chem. 9 (1990) 187.

- [4] Ministerio de Presidencia (2005): REAL DECRETO 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado 15/2005, 1833-1843.
- [5] J.V. Tarazona, M.D. Fernández, M. Milagrosa-Vega, J. Soils Sediments 5 (2005) 121.
- [6] J.J. Nam, B.H. Song, K.C. Eom, S.H. Lee, A. Smith, Chemosphere 50 (2003) 1281.
- [7] S. Lundstedt, P. Haglund, L. Öberg, Anal. Chem. 78 (2006) 2993.
- [8] L. Belkessam, P. Lecomte, V. Milon, A. Laboudigue, Chemosphere 58 (2005) 321.
- [9] J.R. Dean, I.J. Barnabas, I. Fowles, Anal. Proc. 32 (1995) 305.
- [10] J.J. Langenfeld, S.B. Hawthorne, D.J. Miller, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 65 (1993) 338.
- [11] B. Chen, X. Xuan, L. Zhu, J. Wang, Y. Gao, K. Yang, X. Shen, B. Lou, Water Res. 38 (2004) 3558.
- [12] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Sep. Sci. 29 (2006) 2166.
- [13] M.T. Pena, L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2559.
- [14] A. Criado, S. Cárdenas, M. Gallego, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A 1050 (2004) 111.
- [15] G.L. Northcott, K.C. Jones, Environ. Pollution 108 (2000) 19.
- [16] G.L. Northcott, K.C. Jones, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 1103.
- [17] Z. Khan, J. Troquet, C. Vachelard, Int. J. Environ. Sci. Technol. 2 (2005) 275.
- [18] S.A. Barker, J. Chromatogr. A 885 (2000) 115.
- [19] S.A. Barker, LC-GC Int. 11 (1998) 719.

- [20] E.M. Kristenson, L. Ramos, U.A.Th. Brinkman, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 96.
- [21] S.A. Barker, J. Biochem. Biophys. Methods 70 (2007) 151.
- [22] L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A 1077 (2005) 103.
- [23] B. Albero, C. Sánchez-Brunete, J.L. Tadeo, J. AOAC Int. 86 (2003) 576.
- [24] P.M. Loveland, A.P. Reddy, C.B. Pereira, J.A. Field, G.S. Bailey, J. Chromatogr. A 932 (2001) 33.
- [25] M. D. Crouch, S.A. Barker, J. Chromatogr. A 774 (1997) 287.
- [26] Z.Y. Li, Z.C. Zhang, Q.L. Zhou, R.Y. Gao, Q.S. Wang, J. Chromatogr. A 977 (2002) 17.
- [27] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal Chem. 78 (2006) 2772.
- [28] P. Canosa, I. Rodriguez, E. Rubí, R. Cela, Anal. Chem. 79 (2007) 1675.
- [29] M. Krauss, W. Wilcke, Soil Sci. Soc. Am. J. 66 (2002) 430.

**1.2.4. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ
EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS
DE LODO**

Publicación IV

**DEVELOPMENT OF A MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION METHOD FOR THE
DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SEWAGE
SLUDGE SAMPLES**

Anal. Chim. Acta 626 (2008) 155

Doi:10.1016/j.aca.2008.07.053

DEVELOPMENT OF A MATRIX SOLID-PHASE DISPERSION METHOD FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SEWAGE SLUDGE SAMPLES

M^a Teresa Pena, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, Rafael Cela

Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Abstract

A new, single-step extraction and purification method based on matrix solid-phase dispersion (MSPD) was developed to determine 17 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge samples. The MSPD method consists of sample homogenisation, exhaustive extraction and clean-up by a single process. The different operational parameters of the method, such as the type of dispersant, type and amount of additives, clean-up co-sorbent and extractive solvent were evaluated. Reversed-phase (C18) and polymeric (Oasis HLB and Oasis MAX) materials, as well as normal phase sorbents (Florisil, silica, neutral alumina) and an inert support (sand) were tested to assess the sorbents effect on the yield and selectivity of the MSPD process. Analysis of extracts was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence detection. Quantification limits obtained for all of these considered compounds (between 0.0001 and 0.005 $\mu\text{g g}^{-1}$ dry mass) were well below of the limits recommended in the EU. The extraction yields for the different compounds obtained by MSPD ranged from 76.3% to 103.6%. On the other hand, the extraction efficiency of the optimised method is compared with that achieved by microwave-assisted extraction and the method was applied to the analysis of real sewage sludge samples. A certified reference material (sewage sludge (BCR 088)) and a reference material (sewage sludge (RTC-CNS312-04)) were used to validate the proposed method.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Matrix solid-phase dispersion; Sewage sludge analysis; Liquid chromatography

1. INTRODUCTION

Wastewater treatment plants usually generate millions of tons of sludge worldwide every year. Sewage sludges are residues resulting from the treatment of wastewater released from various sources including homes, industries, medical facilities, street runoff and businesses. Sewage sludges contain nutrients and organic matter that can provide soil benefits and are widely used as soil amendments. Utilization of sludge with agricultural purposes is the best alternative for sludge disposal because it recycles both nutrients and organic matter. However, because of the physico-chemical processes involved in wastewater treatment works, the sludge tends to concentrate contaminants such as pesticides, metals, pathogens, industrial solvents, plasticizers and organic pollutants [1-3].

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) constitute a large family of organic compounds widely distributed in the environment. These compounds are originated from different emission sources, mainly related to human activities. Urban areas are important sources of PAHs due to domestic fuel combustion, industrial emissions, car exhaust, uncontrolled spills, surface runoff and atmospheric deposition. As consequence, rainwater and wastewater draining from urban areas into the sewerage system contains relatively large amounts of these pollutants. On the other hand, PAHs showing high octanol-water distribution coefficients are highly lipophilic and therefore tend to adsorb to solid particles of the sewage sludge [4-7].

Since a way of recycling sludges is to spread them on agricultural lands as fertilizer, there is a risk of soil contamination and due to the mutagenic/carcinogenic and endocrine disrupting effects of some PAHs, their presence in soil represent a public health hazard [8,9].

Consequently, maximum acceptable concentrations of several PAHs in sludge have been set in some countries. A 3rd draft of a European Union (EU) directive has regulated the total concentration (sum of 11 PAHs) in sewage sludge for agriculture use to 6 mg kg⁻¹ dm (dry mass basis) [10].

Because the analysis of organic contaminants in environmental solid samples such as soils, sediments and sewage sludge is a necessity for environmental management, fast and accurate analytical procedures are required in order to assess the effectiveness of environmental policy, to check compliance with

environmental quality criteria and to make appropriate decisions regarding site clean-up and remediation.

The extraction is a critical step in the determination of PAHs in sewage sludges, since these hydrophobic compounds are often strongly sorbed. Traditional methods of solid sample preparation, including Soxhlet extraction and sonication [11,12], are both time-consuming and create large amounts of solvent waste, which is not only expensive to dispose of but which may itself cause additional environmental problems. Supercritical fluid extraction (SFE), accelerated solvent extraction (ASE) and microwave-assisted extraction (MAE) have become important new methods for sewage sludge extraction [13-15]. However, disadvantages are the high investment and maintenance costs for the instruments that are needed for SFE, ASE and microwave extraction.

Sewage sludge is often regarded as one of the worst environmental matrices to extract as it can contain a large variety of pollutants as well as amounts of organic matter especially lipidic substances. Moreover, the complexity of the matrices of sludges depends on their origins. If the wastewaters contain industrial sewage in addition to domestic sewage, then sludge are likely to contain various industrial compounds (polymers or other synthesized compounds). Thus, the extraction methods often provide dirty extracts that presented elevated quantities of impurities and require extensive clean-up steps in order to achieve accurate analytical determinations. Solid-phase extraction (SPE) [16,17], gel permeation chromatography (GPC) [11] and selective immunosorbents [18] are frequently used to clean sludge extracts before final quantification.

MSPD has proven to be a fast and efficient alternative to traditional extraction methods. The technique is based on several simple principles of chemistry and physics, involving forces applied to the sample by mechanical blending to procedure extensive sample disruption and the interaction of the sample matrix with a solid support bonded-phase or the surface chemistry of other solid support materials [19]. The homogeneous and thin layer of sample around the dispersant particles leads to highly efficient mass transference processes, which explains the high recoveries normally attained with a low volume of solvent [20]. MSPD is primarily used because of its flexibility, selectivity, and the possibility of performing extraction and cleanup in one step, this resulting in drastically shortening of the analysis time and low consumption of toxic and/or expensive

solvents. The use of mild extraction conditions (room temperature and atmospheric pressure) with a suitable combination of dispersant sorbent and elution solvent normally provides good recoveries and medium selectivity. MSPD has been compared to several other extraction techniques for the extracting a variety of compounds from different matrices. In most cases, the performance of MSPD was found to be superior [20].

MSPD is a sample preparation technique that is increasingly used for the extraction of organic environmental pollutants and drugs from a variety of solid, semisolid and viscous matrices [21] such as fatty foods, fruit and vegetable samples or animal tissues [22].

In recent times, MSPD has been applied to the isolation of organic compounds from environmental matrices. Some examples are the extraction of PAHs from soils [23], halogenated phenols and bisphenols from sediments and sludge [24] and organophosphorus flame-retardants from indoor dust [25].

To the best of our knowledge, the application of the MSPD technique to the determination of PAHs in sewage sludge has only been reported by Sanchez-Brunete et al [26]. However, this previously reported method involves additional processes, such as clean-up of extracts by SPE, increasing the solvent consumption as well as the overall sample treatment time.

The aim of this work was the development and validation of a new simple and efficient MSPD extraction method for the determination of PAHs in sewage sludge samples. The optimised MSPD procedure allows the simultaneous extraction and clean-up of 17 PAHs from complex samples such as sewage sludge, obtaining extracts clean enough to be analyzed directly by HPLC with fluorimetric detection. The 17 PAHs are, naphthalene (Naph), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Anth), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benz[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chry), benzo[e]pyrene (B[e]P), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[a]pyrene (B[a]P), dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P), dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A), benzo[g,h,i]perylene (B[g,h,i]P) and indeno[1,2,3-cd]pyrene (I[1,2,3-cd]P).

The influence of several experimental variables affecting the extraction of the target analytes was studied. Generally, the best way of testing the accuracy and thus the recoveries, of a given sample preparation approach is based on the

use of certified reference materials (CRMs). When CRMs are not available, many authors decide to evaluate the suitability of their optimised MSPD processes by comparison with an alternative, well-established protocol, using real-life polluted samples [20]. In the present work, a CRM (certified sludge (BCR 088)) and a reference material (sewage sludge (RTC-CNS312-04)) were used to validate the proposed method. Moreover, the extraction efficiency of the optimised method is compared with that achieved by microwave-assisted extraction [13].

Finally, the applicability of the proposed method was tested by the determination of PAHs in some real sewage sludge samples.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents, standards and materials

Polypropylene SPE syringe barrels (15 mL capacity) fitted with a single bottom frit and additional 20 μm polyethylene frits were obtained from International Sorbent Technology (Mid Glamorgan, UK). Polypropylene SPE syringe barrels and polyethylene frits were sonicated with acetone and hexane-acetone (50:50, v/v) in two steps, each of 15 min and were stored in clean bags to provide reproducible blanks.

HPLC chromatographic separations were developed in a system comprising a 600E pump with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA) and a fluorescence detector (HP Series 1100, Agilent, Waldbrom, Germany). The autosampler was a 700 WISP (Waters, Milford, MA, USA). Analytical column temperatures were controlled with a MetaTherm 9540 oven, (MetaChem, Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 4.6 mm I.D. Waters PAH C₁₈ column, (particle size 5 μm). A Waters guard-pak, with Nova-Pak C₁₈ inserts, was used to protect the analytical column (both purchased from Waters). Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]) was used for data acquisition.

Elemental analyses were carried out in shared research facilities at the University of Santiago de Compostela.

A Unicen (Orto-Alresa, Madrid, Spain) centrifuge was used to centrifuge the raw sample extracts. Solvent evaporation was carried out with a Turbo Vap II automated nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA).

Acetonitrile and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), and n-hexane, acetone and dichloromethane (Suprasolv) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford MA, USA). Hydrochloric acid (36%) was supplied by Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). EPA-610 Polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and B[e]P (solid, 98.5%) were supplied by Supelco (Bellefonte PA, USA) and D[a,l]P ($10 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) were from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany) potassium hydroxide (Pellets, 85%+, AC), Florisil (60-100 mesh), octyldecyl-funtionalized silica gel (70-230 mesh, 9-12% carbon loading), aluminum oxide activated neutral (150 mesh) and sea sand (50-70 mesh) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and silica gel (230-400 mesh) was obtained from Merck. Silica gel and Florisil contain appreciable traces of PAHs and consequently require some washing before application of MSPD. Sorbents were pre-washed in columns with a hexane-acetone (50:50, v/v) mixture and stored dry before use. For some experiments the normal-phase materials were activated at 105 °C for 48 h and then allowed to cool down in a desiccator before being used in the MSPD cartridge. Anhydrous sodium sulphate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Standard reference material (CRM) BCR 088 was supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium) and RTC-CNS312-04 reference material was obtained from LGC Standards (Teddington Middlesex, UK).

Durapore filters (Millex GV, 13 mm, 0.22 μm) were supplied by Millipore. Silica (Sep-Pak, 500 mg), Florisil (Sep-Pak, 900 mg), Oasis HLB 3 cc (60 mg) and Oasis MAX 3 cc (60 mg) cartridges were obtained from Waters.

Microwave-assisted extractions (MAE) were performed with an Ethos E-320 (1000 W) Microwave Extraction System (Milestone, Leutleirch, Germany) equipped with 12 vessels, each of nominal volume 100 mL. The maximum values of temperature and pressure inside the extraction vessels were 260 °C and 35 bar (500 psi).

2.2. Samples

Sewage sludge sample (S1) used to develop and optimize the procedure was obtained from a wastewater treatment plant (WWTP) located in Lugo (Galicia, northwest Spain). The municipal WWTP receives mainly urban wastewater, but also receives industrial waters principally of dairy plants, effluents of hospitals and the municipal slaughterhouse.

The reference materials, BCR 088 and RTC-CNS312-04, are dried sewage sludges. Additionally, real samples were used to test the applicability of proposed method. A sewage sludge sample (S2) was obtained in 2000 during interlaboratory exercises and three secondary sewage sludge samples (S3, S4, S5) produced by different treatments, were collected in different points of Galicia.

The humidity of the materials was gravimetrically evaluated after drying sample portions of materials in an oven at 105 °C for 2h. The lipid content of samples was evaluated by means of the Bligh and Dyer method [27]. Information about studied samples is compiled in Table 1. As can be seen, materials with different characteristics (lipid content and total carbon) and treatments were taken for this study.

Spiked samples were prepared with sewage sludge by adding a standard solution of analytes in acetonitrile. Sewage sludge (S1) was spiked with PAHs at levels between 0.05 and 5 $\mu\text{g g}^{-1}$, taking into account the concentration values in blank sample. The spiking procedure consisted of mixing, 20 g of sewage sludge sample with 10 mL of a standard solution of studied PAHs in acetonitrile. The mixture was mechanically stirred and allowed to air dry at room temperature for 24 h with occasional mixing. This procedure was carried out several months before sample analysis and all spiked and non-spiked sewage sludge samples were then lyophilized and stored in amber glasses at 4 °C.

Table 1 Characterization of sewage sludge samples.

Sewage sludge samples						
	S1	S2	S3	S4	S5	BCR088 RTC-CNS312-04
Sample treatment	Ana.dig., F. Band	-	Polielect., F. Press	Ana. dig., Polielect., Centrifuge	Lime stab., Polielect., F. press	-
Humidity (%)	6.1	5.8	6.6	5.4	3.8	12.1 8.4
Lipid content (%)	2.9	3.8	6.3	8.9	1.3	9.0 6.1
Elemental analysis (%)						
Carbon	14.1	17.3	38.0	35.9	21.7	27.1 30.4
Nitrogen	1.9	1.1	6.4	6.1	2.6	3.1 4.3
Sulphur	0.6	0.5	0.9	0.8	0.2	1.6 1.3

Ana. Dig., stabilisation by anaerobic digestion; F. Band, dewatering by filter band (include treatment with polyelectrolites); polielect., chemical conditioning with polyelectrolites; F. Press, dewatering by filter press; centrifuge, dewatering by centrifuge; lime stab., chemical stabilisation by lime; (-) not available.

2.3. Sample preparation

2.3.1. MSPD procedure

Under the finally optimized conditions, 0.2 g (weighed accurately) of lyophilized sample was first soaked in 1 mL of saturated methanolic potassium hydroxide solution in a glass mortar, then 1 g of Florisil and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate were added and the mixture was thoroughly blended with the pestle to obtain the complete disruption and dispersion of the sample on the solid support. When blending was complete (after 1 min), the homogeneous mixture was packed into a column containing (from bottom to top) a layer of 1 g of Florisil and another layer of 2 g of silica. These materials act as co-column or clean-up phases in the cartridge elution. A second frit was placed on the top of the sample before careful compression with a plunger. Finally, the target compounds were eluted from the packet columns with 6 mL of dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture. The extract was concentrated to 0.5 mL under a stream of nitrogen in the Turbo Vap. Then, 2 mL of acetonitrile (ACN) was added and the mixture again concentrated to 0.5 mL.

The final concentrated extract was then transferred to a 1 mL volumetric flask and the volume made up to the mark with water. The extract was filtered through a 0.22 µm Durapore filter and 25 µL were injected into the HPLC system.

2.3.2. MAE procedure

Sewage sludge samples were also analysed according to the previously reported saponification-extraction method for PAHs [13]. Briefly, this procedure involves the simultaneous microwave-assisted extraction of PAHs with n-hexane and the hydrolysis of samples with methanolic potassium hydroxide at 129 °C for 17 min, followed by centrifugation and purification with silica and Florisil cartridges. The MAE procedure was used as reference method in the optimization of the MSPD procedure.

2.4. Chromatographic separation

A binary solvent system made of acetonitrile and water was used for chromatographic separations at 1.5 mL min⁻¹. The gradient elution program was as

follows: initial conditions, 50% ACN for 3 min, then a linear ramp to 100% ACN within 17 min and holding at 100% for 8 min. The column temperature was set at 35 °C. Detection was performed at selected fluorescence wavelength programming to obtain the better sensitivity and minimal interference. The excitation/emission wavelengths pairs (nm) were set as follows: 267/330 for Naph; 275/315 for Ace and Flu; 247/357 for Phe; 238/418 for Anth, Flt and Pyr; 286/410 for B[a]A and Chry; 294/425 for B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,l]P, DB[a,h]A and B[g,h,i]P; and 245/500 for I[1,2,3-cd]P.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of conditions for matrix solid-phase dispersion

The selectivity of the MSPD procedure depends on the sorbent/solvent combination used. Most applications of MSPD have used a reversed-phase material, particularly C18 and C8; silica, Florisil and chemically modified sorbents are used less frequently [19]. In recent years, alternative support materials, such as acidic silica, sand, celite, diatomaceous earth, acrylic polymers, alumina, Oasis HLB (a macroporous poly(divinylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) polymer) and molecularly imprinted polymers (MIPs) have been used to enhance the selectivity of the MSPD process [20].

The nature of the elution solvent is also important since the target analytes should be efficiently desorbed while the remaining matrix components should be retained in the column [21].

On the other hand, the intentional ionization or suppression of ionization of analytes and matrix components can greatly affect to nature of interactions of specific target analytes with the matrix and the eluting solvent and should be considered as a variable for attaining reproducible and efficient extractions. This may be accomplished by adding acids, bases, salts, chelating or de-chelating agents, antioxidants, etc, at the time of sample blending and/or as an additive to the eluting solvent [19].

3.1.1. Preliminary extraction assays

The first extraction assays were carried out using the previously reported MSPD method for extraction of PAHs from soil samples [23]. Unsatisfactory results suggest that a very complex matrix such as sewage sludge requires specific methodologies which should be carefully optimised to obtain good performance in terms of recovery values and extract cleanness. Therefore, a new method for determination of PAHs from sewage sludge was developed.

Initial experiments were performed with silica, C18 or Florisil as dispersants. The use of water and anhydrous sodium sulphate in the dispersion, using C18 as solid support, has a positive effect on the extraction efficiency. The addition of 200 μ L of water and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate in dispersion stage was shown to be satisfactory. A hexane-dichloromethane (50:50, v/v) mixture (15 mL) was initially selected as the extraction solvent and 2 g of silica and 1 g of Florisil as clean-up layers. Extracts obtained with silica appeared more sample matrix coextractive, while no significant differences were found when the samples were dispersed with C18 or Florisil. Both sorbents provided higher recoveries and lower sample matrix residues than silica, although yet unsatisfactory. Also, acetonitrile and hexane-acetone (50:50, v/v; 15 mL) mixture, employing C18 as dispersant, provided unsatisfactory recoveries.

Different amounts of organic solvents (methanol and n-hexane-dichloromethane (50:50, v/v) mixture) as well as hydrochloric acid (10%) were also tested as modifiers in the sample blending stage with Florisil but these additives did not enhance either recoveries or extract clean-up.

3.1.2. Optimisation of dispersion conditions

On the basis of these preliminary assays, sorbents with different physical and chemical properties were tested as solid supports for matrix dispersion in alkaline medium. Sand, Oasis MAX, Oasis HLB, alumina, Florisil, activated Florisil, as well as some combinations of them were assayed to assess the sorbents effect on the yield and selectivity of the MSPD process. It should be noted that Oasis HLB and MAX were always used in combination with another solid sorbent (sand, Florisil or anhydrous sodium sulphate) allowing a better blending step. Oasis cartridges

were cut and the appropriate amounts of these polymeric materials were weighted to be used in different experiments.

As shown in Fig. 1, best results in terms of recovery and residue values were obtained when Florisil was used as dispersant. On the other hand, Florisil in combination with anhydrous sodium sulphate produced lower residues than Florisil alone (see table 2).

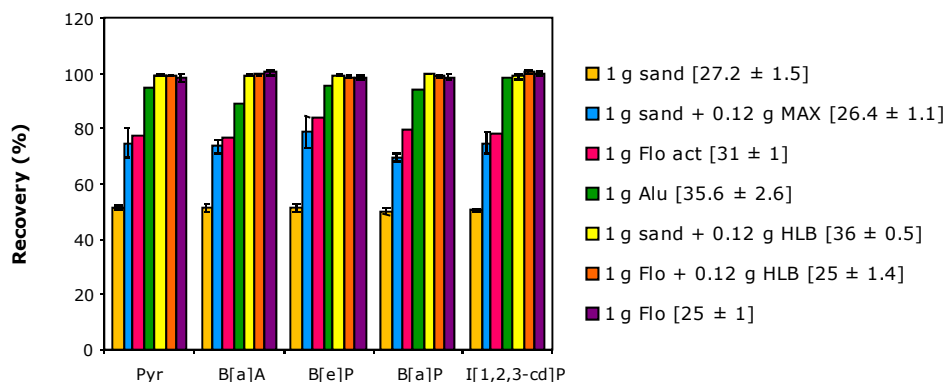


Fig. 1 Influence of different sorbents used as dispersants on the recovery of some representative PAHs in spiked sewage sludge sample by MSPD extraction, using 10 mL of dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture as elution solvent, 500 μ L of saturated methanolic potassium hydroxide solution as additive and 2 g silice and 1 g Florisil as clean-up layers. MAX, Oasis MAX; Flo act, activated Florisil; Alu, neutral alumina; HLB, Oasis HLB; Flo, Florisil. Values in brackets correspond to residues (average (mg g^{-1} sample) \pm standard deviation ($n=3$)) of spiked sewage sludge extracts. Data for triplicate extraction.

Table 2 Amount of residue in sewage sludge extracts and values of recovery of analytes obtained by different MSPD conditions.

MSPD conditions			Results			
Dispersant	Type of additive ^a	Co-column	Extraction solvent	Residue (mg g ⁻¹) ^b	Recoveries (%) ^c	
1 g Sand+0.12 HLB	500 µL KOH	3 g Sil	10 mL DCM-MeOH (90:10, v/v)	39.3 ± 3.3	80	
		3 g Alu		16.6 ± 2.3	75	
	2 g Flo+1 g C ₁₈	2 g Flo+1 g C ₁₈		40.1 ± 5	64	
		2 g Flo+1 g Alu		35.8 ± 0.7	92	
		2 g Flo+1 g Sil		35.5 ± 3.2	98	
		2 g Sil+1 g Flo		36 ± 0.5	99	
1 g Flo	500 µL KOH	3 g Flo	10 mL DCM-MeOH (80:20, v/v)	46.4 ± 2.9	96	
		3 g Flo	10 mL DCM-MeOH (90:10, v/v)	19.9 ± 0.7	73	
	2 g Flo+0.12 g HLB	2 g Flo+0.12 g HLB	2 g Sil+1 g Flo	40.8 ± 2.7	67	
		2 g Sil+1 g Flo		25 ± 1	99	
	1 g Flo+0.5 g Na ₂ SO ₄	500 µL KOH	2 g Sil+1 g Flo	10 mL DCM-MeOH (90:10, v/v)	22.2 ± 0.2	100
			2 g Sil+1 g Flo		18 ± 0.3	100
1250 µL KOH		2 g Sil+1 g Flo	14.0 ± 3.2		64	
		1500 µL KOH	2 g Sil+1 g Flo		17.2 ± 1.0	79
1 g Flo+1 g Na ₂ SO ₄	500 µL KOH	2 g Sil+1 g Flo	22.7 ± 0.7	22.7 ± 0.7	99	
		2 g Sil+1 g Flo		17.6 ± 0.2	95	
	1250 µL KOH	2 g Sil+1 g Flo		17.8 ± 0.5	99	
		1500 µL KOH		2 g Sil+1 g Flo	17.4 ± 0.5	101
1 g Flo+0.5 g Na ₂ SO ₄	1000 µL KOH	2 g Sil+1 g Flo	6 mL DCM-MeOH (90:10, v/v)	18 ± 1.1	95	

0.2 g Spiked sewage sludge sample. Data for three replicates. Alu, neutral alumina; HLB, Oasis HLB; Flo, Florisil; Sil, silica; Na₂SO₄, anhydrous sodium sulphate; KOH, saturated methanolic potassium hydroxide solution; DCM, dichloromethane; MeOH, methanol. ^a Amounts of solvent or saturated methanolic potassium hydroxide solution added in the blending step. ^b Average (mg g⁻¹ sample) of three determinations ± standard deviation. ^c Average of 17 PAHs recoveries, calculated considering values obtained with MAE procedure [13].

A series of experiments were carried out adding different amounts of alkali in the dispersion stage. As can be seen in Fig. 2, for most of the analytes, recoveries were on average 20–60% lower in the absence of alkaline treatment. Recoveries increased and the residues values decreased as the amount of alkali increased, until a constant value (1mL) was reached. It should be stressed that the amount of anhydrous sodium sulphate is also critical. As can be seen in Table 2, the experiments with 1250–1500 μL of methanolic saturated potassium hydroxide and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate provided lower recoveries as compared to similar experiments involving 1 g of anhydrous sodium sulphate.

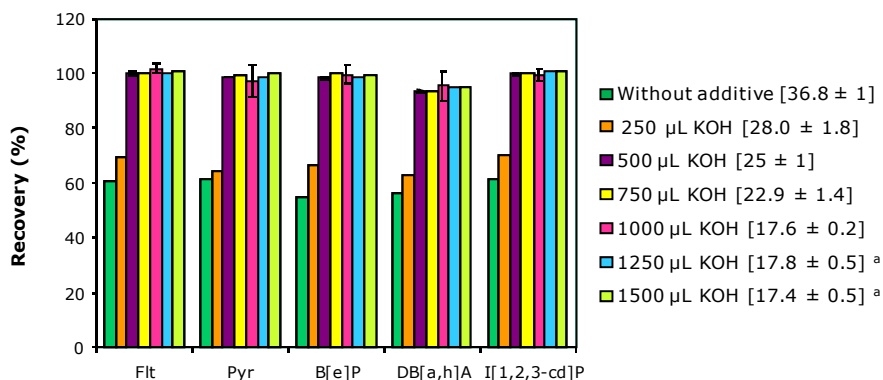


Fig 2 Effect of the amount of saturated methanolic potassium hydroxide solution on the extraction efficiency for some representative PAHs in spiked sewage sludge sample. MSPD conditions were 1 g of Florisil and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate (^a1 g of anhydrous sodium sulphate) as dispersant, 2 g silice and 1 g Florisil as clean-up layers and 10 mL of dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture as elution solvent. KOH, saturated methanolic potassium hydroxide solution. Values in brackets correspond to residues (average (mg g^{-1} sample) \pm standard deviation ($n=3$)) of spiked sewage sludge extracts. Data for triplicate extraction.

At the time of testing dispersant, several clean-up schemes (Table 2) were assayed with the aim of providing sample extracts clean enough for direct injection in the HPLC column, while keeping high recoveries in the PAHs extraction from sewage sludge samples.

As can be seen, Florisil (3 g) or neutral alumina (3 g) as co-column, reduced the amount of sample matrix residues although were unable to provide satisfactory extraction yields. Then, different amounts of Florisil (1 or 2 g) were

assayed in order to evaluate the recoveries and the results demonstrated that lower amounts of Florisil provided a higher residue and highly turbid extracts.

Finally the combination of silica (2 g) and Florisil (1 g) appeared as the better alternative for removing sample matrix interfering compounds, and providing high recoveries for all the target analytes and clean extracts that can be directly injected in the chromatograph.

3.1.3. Effect of the solvent on extraction efficiency

Several elution solvents, such as acetonitrile, dichloromethane, acetone, hexane-acetone (50:50, v/v), hexane-dichloromethane (50:50, v/v) and different dichloromethane-methanol mixtures, were tested for extraction of the PAHs from the dispersed sewage sludge samples.

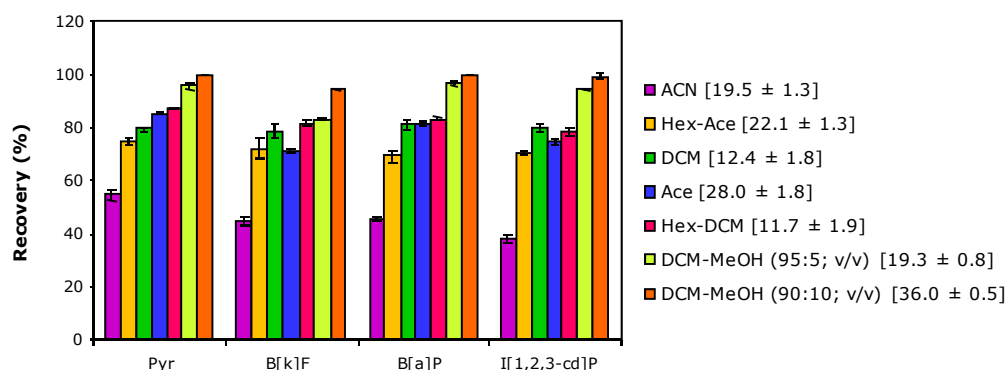


Fig. 3 Recoveries of some representative PAHs in spiked sewage sludge sample with different elution solvents, during the optimisation step. MSPD conditions were 500 μ L of saturated methanolic potassium hydroxide solution as additive, 1 g of sand and 0.12 g of Oasis HLB as dispersant and 2 g silice and 1 g Florisil as clean-up layers. Solvent volume for elution 15 mL, except in DCM-MeOH (90:10, v/v) mixture with 10 mL. ACN, acetonitrile; Hex-Ace, hexane-acetone (50:50, v/v) mixture; DCM, dichloromethane; Ace, acetone; Hex-DCM, hexane-dichloromethane (50:50, v/v) mixture; DCM-MeOH (95:5, v/v), dichloromethane-methanol (95:5, v/v) mixture; DCM-MeOH (90:10, v/v), dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture. Values in brackets correspond to residues (average (mg g^{-1} sample) \pm standard deviation ($n=3$)) of spiked sewage sludge extracts. Data for triplicate extraction.

As can be seen in Fig. 3, dichloromethane provided recoveries about 80% for almost all target compounds. The dichloromethane-methanol (95:5, v/v)

mixture allows better recoveries than dichloromethane alone, although large volumes of solvent (15 mL) are needed to elute the analytes from the cartridge. When eluting the analytes with the dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture, recoveries of all PAHs were increased approximately up to 95%.

Different proportions of methanol and dichloromethane using Florisil as dispersant were assayed to optimize the eluting conditions. The best results were obtained with the dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture. An increase in the proportion of methanol (up to 80:20, v/v), had no significant improvement in recoveries for most of PAHs while provided extra interferences, as evidenced by dark yellow extracts with higher residues obtained after solvent evaporation (Table 2).

The next step in the optimisation of the extraction method is to determine the volume of solvent necessary to ensure reproducible results even for the most retained PAHs. The MSPD cartridge was eluted with five successive 2 mL fractions and each of them was processed and injected in HPLC system. The results showed that 6 mL of dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture allow the quantitative elution of all the analytes from the cartridge.

The overall results showed that the combined effect of 1 g of Florisil and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate as solid-phase, 1 mL of saturated methanolic potassium hydroxide solution as additive, 2 g of silica and 1 g of Florisil as clean-up layers and 6 mL of dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture as elution solvent makes this extraction procedure suitable for determining 17 PAHs in complex matrices such as sewage sludge.

Fig. 4 depicts typical chromatograms obtained for spiked and non-spiked sewage sludge samples working in the optimal conditions described.

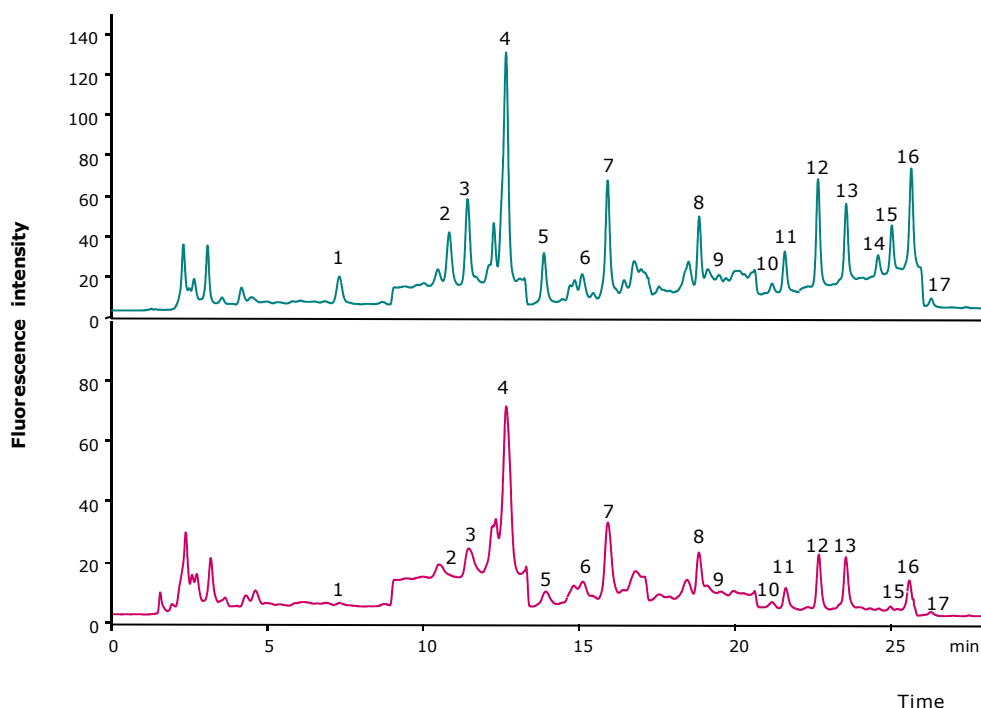


Fig. 4 Chromatograms obtained by HPLC-fluorescence detection, corresponding to (a) spiked sewage sludge at concentrations from 0.1 to 1 $\mu\text{g g}^{-1}$ and (b) non-spiked sewage sludge (S1) extracts obtained using MSPD developed procedure. Peak assignment: (1) Naph, (2) Ace, (3) Flu, (4) Phe, (5) Anth, (6) Flt, (7) Pyr, (8) B[a]A, (9) Chrys, (10) B[e]P, (11) B[b]F, (12) B[k]F, (13) B[a]P, (14) DB[a,l]P, (15) DB[a,h]A, (16) B[g,h,i]P and (17) I[1,2,3-cd]P.

3.2. Performance of the analytical procedure

Calibration curves were prepared at five levels. Each calibration level was injected for triplicate. The range of concentrations and other calibration figures of merit, as well as the detection (LOD, $S/N=3$) and quantification (LOQ, $S/N=10$) limits for the proposed method are summarized in Table 3. The results show that all the analytes were quantified far below the limit imposed by current regulations [10].

Table 3 Linearity, reproducibility, recoveries, LODs and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	Linearity	Reproducibility ^a		Recovery ± R.S.D. (%) ^c		LOD	LOQ
		Calibration range (μg L ⁻¹)	Correlation coefficient	μg g ⁻¹ ± R.S.D. (%) (n=5) ^b	Low level ^d		
Naph	1-200	0.9999	0.2 ± 4.2	76.7 ± 2.8	76.3 ± 0.5	0.0008	0.003
Ace	1-200	0.9999	0.09 ± 0.5	98.2 ± 0.6	96.5 ± 0.3	0.001	0.004
Flu	0.2-40	0.9999	0.2 ± 5.3	93.3 ± 2.3	94.8 ± 1.0	0.0003	0.0009
Phe	0.1-20	0.9997	1.5 ± 0.4	95.7 ± 9.2	97.0 ± 2.6	0.00007	0.0002
Anth	0.1-20	0.9998	0.07 ± 2.6	101.2 ± 0.8	102.5 ± 0.6	0.0001	0.0005
Flt	0.2-40	0.9998	1.5 ± 1.3	98.6 ± 0.6	95.6 ± 1.6	0.0006	0.002
Pyr	0.1-20	0.9999	1.3 ± 0.4	98.9 ± 5.0	99.9 ± 2.0	0.00007	0.0002
B[a]A	0.1-20	0.9996	0.3 ± 2.8	103.6 ± 0.5	100.9 ± 4.2	0.00005	0.0002
Chry	0.1-20	0.9998	1.0 ± 1.1	99.6 ± 0.8	100.1 ± 1.6	0.002	0.005
B[e]P	0.2-40	0.9997	0.6 ± 1.9	103.4 ± 0.5	103.4 ± 2.7	0.0007	0.002
B[b]F	0.2-40	0.9998	0.3 ± 6.0	101.1 ± 0.7	100.9 ± 0.4	0.0002	0.0006
B[k]F	0.1-20	0.9998	0.1 ± 2.3	100.7 ± 0.2	99.5 ± 0.8	0.00003	0.0001
B[a]P	0.1-20	0.9997	0.3 ± 2.4	99.1 ± 2.9	99.1 ± 1.0	0.00005	0.0002
DB[a,i]P	0.1-20	0.9999	0.05 ± 1.6	100.1 ± 0.3	100.4 ± 1.3	0.0001	0.0005
DB[a,h]A	0.2-40	0.9999	0.04 ± 2.3	97.4 ± 1.1	97.5 ± 0.6	0.0001	0.0004
B[g,h,i]P	0.2-40	0.9998	0.3 ± 4.0	100.6 ± 0.7	99.8 ± 0.7	0.0001	0.0003
I[123-cd]P	0.1-20	0.9999	0.3 ± 1.1	101.5 ± 0.7	100.4 ± 1.9	0.0008	0.003

^a Spiked sewage sludge (spiked S1). ^b Concentrations on dry weight basis. ^c Mean \pm relative standard deviation ($n=3$). ^d Sample spiked with PAHs at concentrations from 0.02 to 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$. ^e Sample spiked with PAHs at concentrations from 0.1 to 1 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Reproducibility was assessed by series of five independent experiments carried out on different days, with spiked sewage sludge sample. Average concentrations (on a dry mass basis) and precision between days are reported in Table 3.

Recoveries of the MSPD extraction method were evaluated by processing six independent 0.2 g portions of sewage sludge sample freshly spiked at two concentration ranges for all studied compounds. Non-spiked samples (blank n=3) were also processed and taken into account for calculations. Depicted data were calculated by dividing the difference between concentrations measured for spiked and non-spiked samples by the added one. Significant losses of some PAHs are produced during the solvent evaporation stages associated with sample preparation procedures. In the proposed MSPD method, the solvent evaporation step provides overall losses values ranged from 5-29%. It must be noticed that the values of losses in solvent evaporation process were taken into consideration for recovery calculation. The extraction process was efficient, with recoveries higher than 76% and relative standards deviations lower than 9% (Table 3).

In addition to the use of spiked samples, the extraction efficiency of the MSPD method was compared with that achieved by a previously validated MAE procedure [13] for eight different samples. As can be seen in Table 4, recoveries obtained for MSPD procedure were in good agreement with that obtained by MAE.

Furthermore, to check the performance of the analytical procedure, six replicates of BCR 088 (certified sludge) and RTC-CNS312-04 (reference sludge) were processed by the described procedure. There was good agreement between the values obtained and the certified and reference values (see Table 5 for mean concentrations and confidence intervals).

Table 4 Relative recoveries to those achieved by MAE for sewage sludge samples.

Compound	Relative recovery ± R.S.D. (%)								
	Spiked S1	S1	S2	S3	S4	S5	BCR088	RTC-CNS312-04	Average
Naph	82 ± 3	81 ± 4	97 ± 3	70 ± 1	80 ± 3	102 ± 4	99 ± 2	122 ± 1	90 ± 19
Ace	101 ± 2	118 ± 6	n.d.	n.d.	102 ± 3	n.d.	n.d.	112 ± 5	111 ± 7
Flu	112 ± 4	98 ± 9	104 ± 1	99 ± 2	102 ± 3	110 ± 2	114 ± 7	124 ± 3	106 ± 8
Phe	96 ± 1	100 ± 1	90 ± 1	99 ± 4	99 ± 4	100 ± 3	90 ± 6	98 ± 0.3	97 ± 4
Anth	92 ± 6	100 ± 9	98 ± 5	97 ± 5	97 ± 1	110 ± 4	96 ± 3	102 ± 2	100 ± 5
Flt	96 ± 2	98 ± 3	87 ± 4	101 ± 2	100 ± 1	98 ± 10	101 ± 1	99 ± 2	98 ± 5
Pyr	88 ± 6	100 ± 4	97 ± 1	96 ± 2	100 ± 4	91 ± 4	102 ± 1	94 ± 1	97 ± 3
B[a]A	92 ± 5	93 ± 4	84 ± 12	105 ± 7	95 ± 1	110 ± 3	105 ± 2	98 ± 2	98 ± 8
Chry	100 ± 4	99 ± 2	100 ± 1	n.d.	n.d.	n.d.	99 ± 1	97 ± 6	99 ± 1
B[e]P	96 ± 3	99 ± 6	92 ± 5	96 ± 3	99 ± 1	102 ± 2	92 ± 3	100 ± 1	96 ± 6
B[b]F	86 ± 7	100 ± 4	96 ± 10	102 ± 4	99 ± 2	109 ± 7	102 ± 2	91 ± 3	100 ± 5
B[k]F	89 ± 6	102 ± 7	91 ± 6	107 ± 7	99 ± 2	116 ± 3	106 ± 3	101 ± 7	101 ± 8
B[a]P	96 ± 6	102 ± 2	79 ± 13	108 ± 11	82 ± 1	111 ± 2	105 ± 1	93 ± 3	97 ± 12
DB[a,i]P	-	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	79 ± 4	81 ± 7	80 ± 2
DB[a,h]A	92 ± 6	100 ± 3	73 ± 14	106 ± 7	n.d.	n.d.	88 ± 4	109 ± 2	94 ± 16
B[g,h,i]P	96 ± 5	99 ± 4	100 ± 5	102 ± 10	74 ± 6	100 ± 6	102 ± 2	96 ± 4	96 ± 10
I[123-cd]P	99 ± 2	100 ± 1	99 ± 1	99 ± 6	99 ± 3	102 ± 6	103 ± 1	102 ± 5	100 ± 2

n=3 replicates; n.d. not detected, (-) not available.

Table 5 Measured concentrations and confidence intervals vs. certified and reference values in BCR 088 and RTC-CNS312-04.

Compound	BCR 088		RTC-CNS312-04	
	Certified values ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g g}^{-1}$) $\bar{X} \pm 2\text{SD (n=6)}$	Reference values ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Measured ($\mu\text{g g}^{-1}$) $\bar{X} \pm 2\text{SD (n=6)}$
Naph			2.58 ± 0.53	2.76 ± 0.05
Ace			2.99 ± 0.46	3.06 ± 0.02
Flu			2.01 ± 0.32	2.13 ± 0.01
Phe			0.46 ± 0.11	0.55 ± 0.01
Anth			1.67 ± 0.27	1.67 ± 0.02
Fluor			4.19 ± 0.57	4.5 ± 0.1
Pyr	2.16 ± 0.09	2.08 ± 0.04	4.17 ± 0.51	4.39 ± 0.04
B[a]A	0.93 ± 0.09	1.01 ± 0.01	1.45 ± 0.18	1.54 ± 0.02
Chry			1.12 ± 0.15	1.11 ± 0.01
B[e]P	1.02 ± 0.07	1.03 ± 0.01		
B[b]F	1.17 ± 0.08	1.183 ± 0.001	0.24 ± 0.05	0.252 ± 0.005
B[k]F	0.57 ± 0.05	0.574 ± 0.003	0.68 ± 0.09	0.67 ± 0.02
B[a]P	0.91 ± 0.09	0.96 ± 0.01	0.87 ± 0.12	0.88 ± 0.02
DB[a,h]A			0.41 ± 0.07	0.47 ± 0.02
B[g,h,i]P			0.84 ± 0.17	0.84 ± 0.01
I[1,2,3-cd]P			0.54 ± 0.12	0.55 ± 0.01

3.3. Comparison of extraction procedures

A general comparison of parameters of previously published extraction techniques for the determination of PAHs in sewage sludge samples are presented in Table 6.

MSPD and MAE extraction gave significantly higher recovery values. In the case of MAE, this could be explained by the temperature used ($129\text{ }^{\circ}\text{C}$) as well as the application of microwave energy, both of which enable a better penetration of the solvent into the matrix. However, techniques such as MAE, PLE and SFE require expensive apparatus as well as cooling idle times (e.g., the cell of PLE and the microwave vessels must be left cooling down before opening), increasing the overall sample treatment time.

Table 6 Comparative data of the developed MSPD method with other procedures described in literature for the determination of PAHs in sewage sludge.

Parameters	Soxhlet [28]	Soxhlet [11]	Sonication [12]	SFE [28]	PLE [11]	MAE [13]	MSPD ^a [26]	MSPD proposed method
Sample amount (g)	1	2.5	1	1	2.5	0.2	2	0.2
Extraction solvent	Tol	Hex-DCM (1:1)	MeOH	CO ₂ (5% Tol)	Hex-DCM (1:1)	Hex	DCM	DCM-MeOH (9:1)
Solvent consumption^b (mL)	80	150	50	11.5	60	10	15	6
Extraction time	8 h	18 h	25 min	40 min	20 min	23 min	20 min	10 min
Clean-up	Not required	SPE+GPC	SPE	Not required	SPE+GPC	SPE	SPE	Built in ^c
Determination	HPLC-Flu	GC-MS/MS	HPLC-Flu	HPLC-Flu	GC-MS/MS	HPLC-Flu	GC-MS	HPLC-Flu
Extraction efficiency (%)	63-99	66-92	50-99	35-95	60-93	91-101 ^d	85-108	76-104 ^d
Reproducibility (R.S.D. %)	<22	<17	<17	<20	<42	<6	<11	<6
LOQ (µg g⁻¹)	0.05-5	0.0001-0.002 ^e	0.0002-0.08	0.04-5	0.0001-0.002 ^e	0.0002-0.01	0.0001-0.002	0.0001-0.005
Cost	Low	Low	Low	Medium	Medium	Medium	Low	Low

The 16 PAHs listed in the US Environmental Protection Agency (US EPA) priority list were considered on these papers. B[e]P was also included in MAE [13], while B[e]P and DB[a]P were including in this MSPD work. 27 PAHs were considered in MSPD [26]. Tol, toluene; Hex, n-hexane; DCM, dichloromethane; MeOH, methanol; Hex-DCM (1:1), hexane-dichloromethane (50:50, v/v) mixture; DCM-MeOH (9:1), dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture; SPE, solid-phase extraction; GPC, gel permeation chromatography; HPLC-Flu, HPLC-fluorescence detection; GC-MS/MS, gas chromatography-mass spectrometry. ^a MSPD assisted by sonication; ^b Solvent consumption only in extraction stage; solvent consumption in clean-up and solvent exchanges not included; ^c The extraction and clean-up of samples were carried out in a single step; ^d Losses values associated with solvent evaporation processes were taken into account for recovery calculations; ^e Values calculated considering data provided by authors in the paper.

Extraction and clean-up were carried out in a single step in the proposed MSPD method, while PLE involves multi step clean-up process, such as clean-up by SPE and GPC, and additional evaporation process. Sonication and MSPD assisted by sonication may be an interesting and cheap alternative technique but also requires clean-up of extracts by SPE.

The Soxhlet extraction should not be ignored as it allows efficient extraction, using very cheap equipment. Its main drawbacks are, of course, the large solvent volumes used and the long extraction times required. Lower solvent consumption implies cost reduction, waste disposal and less exposure to solvent vapours.

In summary, the optimised MSPD procedure appears to be an advantageous alternative when compared to the other extraction techniques. The main drawback is that experimental conditions should be carefully optimised in order to ensure efficient extraction but the proposed MSPD method provides quantification limits and extraction efficiencies similar to the other techniques, with the advantages of being faster and using low volumes of organic solvents.

3.4. Application to real sewage sludge samples

The applicability of the proposed MSPD method was tested by the determination of PAHs in five sewage sludge samples (S1-S5), differing in the type of wastewater and the applied treatment technology.

It is interesting to note that all samples were processed by an alternative technique (MAE) [13] and there was good agreement between MAE measurements and MSPD evaluated concentrations.

As can be seen in Table 7, PAHs were detected in all of the samples. Total concentrations for the PAHs analysed between 1.1 and 10.3 mg kg⁻¹ (dm, dry mass basis) were found in sewage sludge samples. It should be stressed that the value of 10.3 mg kg⁻¹ appeared only in the sewage sludge sample coming from the interlaboratory exercises. Remaining sludge samples exhibit contents of the PAHs not exceeding 8.1 mg kg⁻¹ (sum of the 17 PAHs considered in this study). The PAHs concentrations obtained in this study are similar to those found in literature [26,29].

Table 7 Concentration of PAHs found in different sewage sludge samples by MSPD procedure.

Compound	S1	S2	S3	S4	S5
Naph	0.1 ± 5.3	0.2 ± 0.2	0.1 ± 1.7	0.3 ± 2.3	0.4 ± 0.2
Ace	0.03 ± 3.1	n.d	n.d	0.2 ± 0.7	n.d
Flu	0.1 ± 0.3	0.3 ± 0.05	0.1 ± 3.9	0.5 ± 0.7	0.1 ± 3.8
Phe	0.8 ± 0.7	1.1 ± 1.6	0.2 ± 2.7	3.9 ± 3.6	0.4 ± 0.8
Anth	0.04 ± 0.7	0.1 ± 5.3	0.01 ± 2.6	0.2 ± 0.7	0.02 ± 5.4
Flt	0.7 ± 2.6	1.8 ± 2.4	0.2 ± 2.3	1.0 ± 0.6	0.3 ± 2.2
Pyr	0.6 ± 3.8	1.6 ± 1.3	0.2 ± 0.9	1.1 ± 4.3	0.2 ± 5.7
B[a]A	0.1 ± 1.7	0.4 ± 11.4	0.02 ± 1.6	0.1 ± 1.4	0.03 ± 0.3
Chry	0.3 ± 1.2	1.2 ± 0.6	n.d	n.d	n.d
B[e]P	0.2 ± 1.6	1.0 ± 5.5	0.1 ± 0.6	0.6 ± 1.4	0.1 ± 1.5
B[b]F	0.1 ± 0.2	0.8 ± 9.9	0.04 ± 5.1	0.1 ± 1.3	0.1 ± 2.9
B[k]F	0.1 ± 0.2	0.3 ± 11.8	0.01 ± 0.8	0.03 ± 3.9	0.01 ± 4.0
B[a]P	0.1 ± 0.2	0.5 ± 11.4	0.03 ± 1.2	0.05 ± 5.8	0.03 ± 2.1
DB[a,l]P	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
DB[a,h]A	0.02 ± 2.8	0.2 ± 15.5	0.002 ± 8.7	n.d	n.d
B[g,h,i]P	0.1 ± 1.3	0.6 ± 1.6	0.1 ± 0.3	0.1 ± 4.4	0.04 ± 1.0
I[1,2,3-cd]P	0.1 ± 0.5	0.5 ± 5.7	0.02 ± 1.2	0.05 ± 0.5	0.02 ± 6.6
Σ PAHs	3.5	10.3	1.1	8.1	1.7

Average ($\mu\text{g g}^{-1}$) \pm relative standard deviation (R.S.D. %); concentrations on dry weight basis; n=3 replicates per sample; n.d, no detected; Σ PAHs, sum of 17 PAHs considered in this study.

Regarding the contribution of each individual PAHs, the highest concentration was found for Phe, Flt and Pyr. The most toxic of all PAHs, B[a]P, was also found with concentrations that varied between 0.03 and 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

High concentrations of Phe and Pyr could be explained because the sewage water received in WWTP is mainly of domestic origin. Charbroiling of meat accounts for a major source of these compound together with Anth and Flt, in households. B[ghi]P together with Chry and I[1,2,3-cd]P are compounds whose source can be attributed principally to pyrolytic process, probably arising from urban traffic [30].

4. CONCLUSIONS

An analytical methodology for the determination of PAHs in sewage sludge was developed. The results showed good performance of the analytical protocol. Quantification limits achieved by the method allow the application of the procedure below the levels imposed by existing regulations. Recoveries using MSPD extraction were in all cases satisfactory, offering good agreement with the certified values and also comparable with the results obtained using MAE.

The proposed procedure offers significant saving of reagents and time compared to other techniques used being capable of providing a rapid isolation of the target analytes as was demonstrated by processing real samples, a reference material and a certified reference material.

In summary, this method constitutes a significant advance in simplicity and efficiency, which makes it possible to screen many samples and can be used for routine monitoring, including routine quality control of sewage sludge to be used on agricultural landfilling according to the future European Union sludge directive, characterizations of contaminated sites and monitoring of remedial processes.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project CTQ2006-03334/BQU), E.U. FEDER funding and the Xunta de Galicia (project PGIDIT06PXIB237039PR). T. Pena gratefully acknowledges her doctoral FPI grant from the Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

- [1] E.Z. Harrison, S.R. Oakes, M. Hysell, A. Hay, Sci. Total Environ., 367 (2006) 481.
- [2] L. Bontoux, M. Vega, D. Papameletiou, Urban wastewater treatment in Europe: what about the sludge?, IPTS Report, 23 (1998) 5.
- [3] E. Abad, K. Martínez, C. Planas, O. Palacios, J. Caixach, J. Rivera, Chemosphere, 61 (2005) 1358.

- [4] H.R. Rogers, *Sci. Total Environ.*, 185 (1996) 3.
- [5] E. Manoli, C. Samara, *J. Environ. Qual.*, 28 (1999) 176.
- [6] P.E.T. Douben, *PAH: An Ecological Perspective*, Willey, New York, 2003.
- [7] K.E.C. Smith, M. Green, G.O. Thomas K.C. Jones, *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 2141.
- [8] R.G. Harvey, *Polycyclic aromatic hydrocarbons*, Wiley-VCH, New York 1996.
- [9] C.A. Menzie, B.B. Potocki J. Santodonato, *Environ. Sci. Technol.*, 26 (1992) 1278.
- [10] Council of the European Community, 27 April, 2000. Working document on Sludge, 3rd Draft, Brussels.
- [11] M.I.H. Helaleh, A. Al-Omair, A. Nisar B. Gevao, *J. Chromatogr. A*, 1083 (2005) 153.
- [12] J.L. Santos, I. Aparicio E. Alonso, *Anal. Chim. Acta*, 605 (2007) 102.
- [13] M.T. Pena, L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 2559.
- [14] J.D. Berset, R. Holzer, *J. Chromatogr. A*, 852 (1999) 545.
- [15] E. Trably, N. Delgènes, D. Patureau J.P. Delgènes, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 84 (2004) 995.
- [16] P. Oleszczuk, S. Baran, *J. Hazard. Mat. B*, 113 (2004) 237.
- [17] V. Flotron, J. Houessou, A. Bosio, C. Delteil, A. Bermond, V. Camel, *J. Chromatogr. A*, 999 (2003) 175.
- [18] C. Miège, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay, V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 859 (1999) 29.
- [19] S.A. Barker, *J. Chromatogr. A*, 885 (2000) 115.
- [20] M. García, P. Canosa, I. Rodríguez, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2008) in press.

- [21] E.M. Kristenson, L. Ramos, U.A.T. Brinkman, Trends Anal. Chem., 25 (2006) 96.
- [22] S.A. Barker, J. Biochem. Biophys. Methods, 70 (2007) 151.
- [23] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, J. Chromatogr. A, 116 (2007) 32.
- [24] E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Chem., 78 (2006) 2772.
- [25] M. García, I. Rodríguez, R. Cela, Anal. Chim. Acta, 590 (2007) 17.
- [26] C. Sánchez-Brunete, E. Miguel, J.L. Tadeo, J. Chromatogr A, 1148 (2007) 219.
- [27] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens, J. Food Comp. Anal., 14 (2001) 93.
- [28] C. Miège, J. Dugay and M.C. Hennion, J. Chromatogr. A, 823 (1998) 219.
- [29] S. Pérez, M. Guillamón, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 57.
- [30] P. Villar, M. Callejón, E. Alonso, J.C. Jiménez, A. Guiraúm, Chemosphere, 64 (2006) 535.

1.2.5. DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO MEDIANTE EXTRACCIÓN SELECTIVA CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Publicación V

DEVELOPMENT OF A SAMPLE PREPARATION PROCEDURE OF SEWAGE SLUDGE SAMPLES FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BASED ON SELECTIVE PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION

J. Chromatogr. A 1217 (2010) 425

Doi:10.1016/j.chroma.2009.11.081

DEVELOPMENT OF A SAMPLE PREPARATION PROCEDURE OF SEWAGE SLUDGE SAMPLES FOR THE DETERMINATION OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS BASED ON SELECTIVE PRESSURIZED LIQUID EXTRACTION

M^a Teresa Pena, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, R. Cela

*Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Instituto de Investigación y Análisis
Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain*

Abstract

An automated, simple and sensitive method based on selective pressurized liquid extraction (SPLE) was developed for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludge samples. The new sample preparation procedure consists of on-line clean-up by inclusion of sorbents in the extraction cell, and combines elevated temperatures and pressures with liquid solvents to achieve fast and efficient removal of target analytes from complex sewage sludge matrices. The effects of various operational parameters (e.g. sample pretreatment, extraction solvent, temperature, pressure, static time, etc.) on the performance of SPLE procedure were carefully investigated, obtaining the best results when SPLE conditions were fixed at 140 °C, 1500 psi, static time of 5 min and n-hexane as extraction solvent. A new programmed temperature vaporization-gas chromatography-tandem mass spectrometry method based on large volume injection (PTV-LVI-GC-MS/MS) was also developed and analytical determinations were performed by high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection and GC-MS/MS. The extraction yields for the different compounds obtained by SPLE ranged from 84.8% to 106.6%. Quantification limits obtained for all of these studied compounds (between 0.0001 and 0.005 µg g⁻¹, dry mass) were well below the regulatory limits for all compounds considered. To test the accuracy of the SPLE technique, the optimized methodology was applied to the analysis of a certified reference material (sewage sludge (BCR088)) and a reference material (sewage sludge (RTC-CNS312-04)), with excellent results.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Sewage sludge analysis; Selective pressurized liquid extraction; Liquid chromatography; Gas chromatography

1. INTRODUCTION

Sewage sludge may be a useful material to be used in agriculture as fertilizer or soil conditioner because of its high organic matter content, as well as nitrogen and phosphorous concentrations. However, because of the physical-chemistry processes involved in wastewater treatment, sludge tends to concentrate pollutants with low water solubility and adsorption capacity [1].

High concentrations of different contaminants have been found in sewage sludge samples [2-4]. Consequently, the application of sewage sludge on agricultural land can lead to the accumulation of toxic pollutants and pathogenic microorganism in soils, plants and grazing animal [5], as well as enter in the food chain or be transported toward rivers or groundwater [6].

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are well-known carcinogens and mutagens [7] which are present in sludges [8-9]. In wastewater treatment plants, PAHs are almost completely removed from wastewater (up to 90%), being concentrated in sludge because of their poor solubility in water and high adsorption capacity on solid particles [2]. As a consequence, the range of PAH concentrations in sewage sludge is varying widely from a few micrograms up to several hundred milligrams per Kg of dry matter and depends on the origin of wastewater as well as the mineralization level of organic matter [9, 10].

In order to improve the sewage sludge management and control the quality of the sludge that is going to be applied to soil, the third draft of a European Union (EU) directive has set maximum acceptable concentrations of some organic compounds. The total concentration of PAHs (sum of 11 compounds) in sewage sludge for agriculture use, have been regulated to $6 \text{ mg Kg}^{-1} \text{ dm}$ (dry mass) [11].

One of the main problems for the implementation of the future EU directive is the need of accurate, sensitive, rapid and low cost procedures for the routine determination of these and other pollutants in sewage sludge. Sample preparation and especially extraction is a critical step in PAHs analysis because these hydrophobic compounds are strongly sorbed to the solid materials. Traditionally, Soxhlet extraction has been used for the extraction of PAHs in sewage sludges [12-13], but this procedure does not provide enough energy to release the analytes rapidly. In consequence, it requires very long extraction times and large amounts of

organic solvents. New approaches have been used in order to overcome these disadvantages and improve automation. Thus, microwave assisted extraction (MAE) [14], supercritical fluid extraction [15], ultrasonic extraction (USE) [9], matrix solid-phase dispersion (MSPD) [16] and pressurized liquid extraction (PLE) [8, 12, 13, 17] have been proposed as alternative techniques.

The clean-up of the extracts is also a very important step in determination of PAHs in sludge samples. Selective extraction of specific compound from sewage sludge is a very complicated task because it can contain a large variety of pollutants as well as organic matter, especially lipidic substances. Thus, in spite of a good optimization of extraction parameters to obtain a selective method, complex mixtures of organic compounds and matrix components are frequently present in the extracts and must be eliminated in order to achieve accurate analytical determinations. Solid-phase extraction [14, 18], gel permeation chromatography [12] and selective immunosorbents [19] are usually employed to clean sludge extracts before final separation and quantification.

PLE is a low solvent consuming, fast, effective and automated extraction technique, which was introduced in 1996 [20-21]. PLE is an attractive technique because 24 samples can be processed sequentially in unattended operation. Moreover different sample sizes can be accommodated and filtration is not required after extraction [21]. PLE offers also the possibility of controlling the selectivity of the extraction by loading a stationary phase in the extraction cell. The amount of co-extracted interferences can be reduced by adding different sorbents to the PLE cells. Additionally, the sample itself can also be mixed and dispersed with the same or with a different sorbent. Thus, a one-step PLE method avoids the exhaustive clean-up of extracts prior to analysis increasing the possibilities of automation.

PLE has been chosen for the extraction of a wide range of compounds from various matrices [22]. Some examples are the extraction of parabens and triclosan from indoor dust [23], organophosphate triesters from sediments [24] and pharmaceuticals [25] from sewage sludge samples. In particular, it has been used for extraction of PAHs from soils [26], sediments [27], atmospheric particulate matter [28], pine needles [29], food and biological samples [30] and sewage sludges [8, 12, 13, 17].

Some comparative studies carried out between PLE and conventional techniques, such as Soxhlet extraction, showed that the performance of PLE was consistently equivalent or better than traditional methods [8]. Flotron et al. compared traditional techniques (Soxhlet and USE) with PLE and MAE for the effectiveness of extracting PAHs from sewage sludge and PLE appeared to be a promising technique, giving high recoveries with moderate extraction times and solvent volumes [13].

The aim of this study was to develop and validate a new selective pressurized liquid extraction (SPLE) method that integrates exhaustive extraction with in-cell clean-up. The optimized SPLE procedure allows the selective extraction of 19 PAHs (naphthalene (Naph), acenaphthylene (Acy), acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Anth), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), benz[*a*]anthracene (B[*a*]A), chrysene (Chry), 5-methylchrysene (5-MC), benzo[*e*]pyrene (B[*e*]P), benzo[*b*]fluoranthene (B[*b*]F), benzo[*k*]fluoranthene (B[*k*]F), benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P), dibenzo[*a,l*]pyrene (DB[*al*]P), dibenz[*ah*]anthracene (DB[*ah*]A), benzo[*ghi*]perylene (B[*ghi*]P) and indeno[1,2,3-*cd*]pyrene (I[1,2,3-*cd*]P)) from sewage sludge, obtaining extracts clean enough to be analyzed directly by two different chromatographic methods, and leading to substantial time and solvent savings as well as less sample manipulation compared to PLE with off-line clean-up.

The influence of the different experimental parameters (e.g. sample pretreatment, extraction solvent, temperature, pressure, static time, etc.) on the yield of the sample preparation step was investigated and operating conditions were optimized. Moreover, a new programmed temperature vaporization-gas chromatography-tandem mass spectrometry (PTV-GC-MS/MS) method based on large volume injection (LVI) was developed and subsequently employed to analyze sewage sludge extracts.

A certified reference material (certified sludge (BCR088)) and a reference material (sewage sludge (RTC-CNS312-04)) were used to validate the proposed method. Finally, the applicability of the developed procedure was tested by the determination of PAHs in some real sewage sludge samples.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents, standards and materials

Elemental analyses were carried out in shared research facilities at the University of Santiago de Compostela.

An ultrasonic water bath was purchased from Selecta Ultrasounds (Barcelona, Spain). A Turbo Vap II automated nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) was used to evaporate the extracts obtained by SPLE.

Acetonitrile (ACN) and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), n-hexane, dichloromethane and acetone (Suprasolv) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford MA, USA). Anhydrous sodium sulphate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). EPA-610 Polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and B[e]P (solid, 98.5%) were supplied by Supelco. 5-MC ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) and DB[a]P ($10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) were from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Potassium hydroxide (Pellets, 85%+, AC), Florisil (60-100 mesh), aluminium oxide activated neutral (150 mesh) and sea sand (50-70 mesh) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain), and silica gel (230-400 mesh) was obtained from Merck. Silica gel and Florisil contain appreciable traces of PAHs and consequently required washing in columns with a hexane-acetone (50:50, v/v) mixture and were kept stored dry before use. BCR 088 was supplied by the Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM, Geel, Belgium) and RTC-CNS312-04 reference material was obtained from LGC Standards (Teddington Middlesex, UK).

Cellulose filters for ASE 200 extraction cells (20 mm) was obtained from Restek and Durapore filters (Millex GV, 13 mm, $0.22\text{ }\mu\text{m}$) were supplied by Millipore.

2.2. Samples

Optimization of SPLE parameters was carried out with a pool of different sewage sludge samples, with total carbon content of 32.6%. The pooled sample was obtained by mixing four different sewage sludge samples from urban sludge treatment plants located in the area of Galicia.

The reference materials, BCR 088 and RTC-CNS312-04, are dried sewage sludges. Additionally, real samples were used to test the applicability of proposed method. Six secondary sewage sludge samples were collected in different wastewater treatment plants in Galicia.

The moisture content of the materials was gravimetrically evaluated after drying sample portions of materials in an oven at 105 °C for 12 h. The lipid content of samples was evaluated by means of the Bligh and Dyer method [31]. Information about studied samples is compiled in Table 1. As can be seen, materials with different characteristics (lipid content and total carbon) were taken for this study.

Table 1 Proprieties of analyzed sewage sludge samples.

	Sewage sludge samples								
	Pooled sample	S1	S2	S3	S4	S5	S6	BCR088	RTCCNS312-04
Moisture content (%)	8.9	6.6	5.4	3.8	10.3	34.1	17.0	12.1	8.4
Lipid content (%)	6.2	6.3	8.9	1.3	20.8	13.2	15.8	9.0	6.1
Elemental analysis (%)									
Carbon	32.6	38.0	35.9	21.7	42.3	33.0	50.0	27.1	30.4
Nitrogen	5.5	6.4	6.1	2.6	3.1	3.4	3.1	3.1	4.3
Sulphur	0.8	0.9	0.8	0.2	1.0	0.3	0.2	1.6	1.3

Spiked samples were prepared by adding a standard solution of analytes in acetonitrile. Pooled sewage sludge sample was spiked with PAHs at levels between 0.05 and 5.72 $\mu\text{g g}^{-1}$, taking into account the concentration values in blank sample. The spiking procedure consisted of mixing, forty grams of pool with 10 mL of a standard solution of studied PAHs in ACN. The mixture was mechanically stirred and allowed to air dry at room temperature for 24 h with occasional mixing. Then, the solvent was slowly evaporated under frequent homogenization. This procedure was carried out several months before sample analysis and all spiked and non-spiked samples once prepared were lyophilized and stored in amber glasses at 4 °C.

2.3. SPLE procedure

Extractions were performed on an ASE 200 system (Dionex, Co., Sunnyvale, CA, USA) equipped with a 24-sample carousel, 11-mL stainless steel cells, and 40-mL collection vials. PLE cells were pre-cleaned by sonication with a hexane-acetone (1:1, v/v) mixture for 15 min in order to obtain reproducible blanks and avoid the presence of interfering compounds that could difficult the trace level determination of PAHs.

Under the finally conditions, 0.2 g (weighed accurately) of lyophilized sample was first soaked in 1 mL of saturated potassium hydroxide solution in methanol (KOH (MeOH) sat.) in a glass mortar, then 1 g of Florisil and 0.5 g of anhydrous sodium sulphate (Na_2SO_4) were added and the mixture was thoroughly blended with the pestle to obtain a homogeneous mixture.

Two cellulose filters were placed at the bottom of each 11 mL cell to avoid the collection of suspended powders in the extraction. A thin layer of sand followed by 1 g of Florisil and 2 g of silica were introduced in the cell in order to perform in situ clean-up. After loading the clean-up sorbents, the homogeneous sample mixture was transferred to cells. The remaining volume of the cell was filled up with sand in order to reduce the void volume in the cells and avoid solvent channelling as well as an undesirable increase in the total extract volume. Finally, a third cellulose filter was placed on the top and the cell was tightly closed and placed into the carousel of the ASE system.

All extractions were performed by preheating the cell for 6 min before filling with solvent (preheat method). PAHs were removed using n-hexane in a single static extraction cycle at 140 °C and 1500 psi for 5 min. The total flush volume and the cell purge time were 11 mL (100% of its capacity) and 60 s, respectively.

Three mililiters of the total SPLE extract (21 ± 1 mL) was concentrated to 0.5 mL under a stream of nitrogen in the Turbo Vap. Then, 2 mL of ACN was added and the mixture again concentrated to 0.5 mL. The final concentrated extract was then transferred to a 1 mL volumetric flask and the volume made up to the mark with water. The extract was filtered through a 0.22 μm Durapore filter and 20 μL were injected into the high performance liquid chromatography (HPLC) system.

Obviously, the solvent change stage was not necessary to GC-MS/MS analysis. Therefore, 1 mL of SPLE extract was directly filtered through a 0.22 μm Durapore filter and 25 μL was injected into the GC-MS/MS system.

2.4. Instrumental analysis

2.4.1. HPLC-fluorescence detection analysis

HPLC chromatographic separations were developed in a system comprising a 600E pump with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA) and a fluorescence detector (Flu) (HP Series 1100, Agilent, Waldbrom, Germany). The injector (Rheodyne Model 7725i, Cotati, CA, USA) was fitted with a 20 μL loop. Analytical column temperatures were controlled with a MetaTherm 9540 oven, (MetaChem, Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 4.6 mm I.D. Waters PAH C₁₈ column, (particle size 5 μm). A Waters guard-pak, with Nova-Pak C₁₈ inserts, was used to protect the analytical column (both purchased from Waters). Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]) was used for data acquisition.

A binary solvent system made of ACN and water was used for chromatographic separations at 1.5 mL min⁻¹. The gradient elution program was as follows: initial conditions, 50% ACN for 3 min, then a linear ramp to 100% ACN within 17 min and holding at 100% for 8 min. The column temperature was set at 35 °C. Detection was performed at selected fluorescence wavelength programming to obtain the better sensitivity and minimal interference. The excitation/emission wavelengths pairs (nm) were set as follows: 267/330 for Naph; 275/315 for Ace and Flu; 247/357 for Phe; 238/418 for Anth, Flt and Pyr; 286/410 for B[a]A, Chry and 5-MC; 294/425 for B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a]P, DB[ah]A and B[ghi]P; and 245/500 for I[1,2,3-cd]P.

2.4.2. PTV-LVI-GC-MS/MS analysis

In order to validate the developed analytical methodology and for comparative purposes, some sewage sludge samples were also analyzed by GC-MS/MS method, using LVI.

The PTV-LVI-GC-MS/MS analysis was performed using a Varian 450-GC gas chromatography (Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA) coupled to an ion trap mass spectrometer Varian 240-MS with a waveboard for multiple MS (MS_n) analysis operating in the external trap mode. The chromatograph was equipped with an automatic injector CP-8400 autosampler and a 1079 programmed temperature vaporization (PTV) injector (both from Varian) with a split liner with frit (3.4 mm x 5.0 mm x 54mm, Siltek deactivated) (Restek, Bellefonte, PA, USA). The system was operated by Varian MS Workstation v6.9.1 software. Separation was carried out on a J&W HP-5MS capillary column (30m x 0.25mm I.D., 0.25 μ m film thickness) from Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA).

Helium (purity 99.999%; Carbueros Metálicos, A Coruña, Spain) was employed as carrier gas at a constant column flow of 1.5 mL min⁻¹. The GC oven temperature was programmed from 60 °C (held 3 min) to 230 °C at 15 °C min⁻¹; then, ramped to 250 °C min⁻¹ at 10 °C min⁻¹, increased at a rate of 3 °C min⁻¹ up to 280 °C (held 3 min) and finally increased to 300 °C at 3 °C min⁻¹ (held 2 min). The total running time was 38 min.

Aliquots of 25 μ L of sample extract were injected into the GC system operating at a syringe injection flow rate of 20 μ L s⁻¹. The initial injector temperature of 60 °C was held for 0.3 min and then increased at 100 °C min⁻¹ to 300 °C (held 25 min). The injector split ratio was initially set at 20:1. The splitless mode was switched on from 0.3 to 3 min. At 3 min, the split ratio was set at 50:1 and reduced to 20:1 at 10 min. Cryogenic cooling with CO₂ was applied when the injector temperature was 280 °C in order to reach the initial injector temperature as fast as possible before continuing with the next injection.

The ion trap mass spectrometer was operated in the electron impact (EI) ionization positive mode (+70eV) using an external ionization configuration. The trap, manifold and transfer line temperatures were maintained at 220, 40 and 300 °C, respectively. General parameters were as follows: filament/multiplier delay, 6.5 min; multiplier offset +200 V, filament emission current 90 μ A, automatic gain control target value 5000 counts, and collision induced dissociation (CID) waveform, resonant. Specific conditions for each target compound are listed in Table 2. The target analytes were identified by retention times and EI-MS/MS libraries of standards.

Table 2 Selected MS/MS experimental parameters and retention times of target compounds.

Compound	Retention time (min)	Parent ion (<i>m/z</i>)	Excitation storage level (V)	Excitation amplitude (V)	Quantification ion (<i>m/z</i>)
Naph	7.72	128	48.8	1.4	102
Acy	10.32	152	57.9	2.0	150
Ace	10.60	153	58.3	1.2	152
Flu	11.46	166	63.3	1.2	165
Phe	13.01	178	67.8	1.7	176
Anth	13.09	178	67.8	1.7	176
Flt	14.96	202	77.0	2.8	200
Pyr	15.36	202	77.0	2.8	200
B[a]A	17.92	228	86.9	2.5	226
Chry	18.01	228	86.9	2.5	226
B[b]F	21.29	252	96.0	3.7	250
B[k]F	21.38	252	96.0	3.7	250
B[e]P	22.29	252	105.2	3.4	250
B[a]P	22.48	252	105.2	3.4	250
I[1,2,3-cd]P	27.01	276	105.2	4.3	274
DB[ah]A	27.18	278	105.9	3.8	276
B[ghi]P	28.18	276	105.2	4.3	274

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. PTV-LVI-GC-MS/MS optimization

Optimization of the chromatographic conditions was accomplished using a standard mixture solution of all target compounds in n-hexane. Firstly, different oven programs were tested in order to obtain a suitable separation of the studied PAHs. The injector program was based on a previously reported PTV-LVI-GC-MS/MS methodology [32] for analysis of PAHs in water but parameters such as injector heating rate and injection volume were evaluated to obtain good sensitivity and improve the peak shapes.

In order to investigate the influence of the heating rate, a standard mixture of PAHs was repeatedly injected, using different injector programs. The initial temperature (60°C) was increased to 300 °C at 70 °C min⁻¹, 100 °C min⁻¹ and 180 °C min⁻¹. All studied compounds showed better responses at higher heating rates,

the influence of the heating rate being more pronounced for less volatile PAHs. The PAHs responses decreased slightly at $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ whereas an important decreasing of the signal was observed at $70\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. The opposite effect was observed in the peak shapes, obtaining a deterioration of peak shape (mainly for more volatile compounds) by increasing the heating rate at $180\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$. Therefore, $100\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ was chosen as the optimum injector heating rate in order to avoid peak distortion while obtaining high responses for the target compounds.

The effect of injection volume was also investigated. Different injection volumes (7, 14, 25, 50 and $70\text{ }\mu\text{L}$) were tested to obtain the higher sensitivity without deterioration of peak shape. The experimental results showed that the sensitivity was increased with increasing the injection volume from 7 to $25\text{ }\mu\text{L}$ while keeping good shape of peaks. However, distorted and/or double peak were observed when the injection volumes were increased to 50 and $75\text{ }\mu\text{L}$. Consequently, an injection volume of $25\text{ }\mu\text{L}$ was established.

The MS/MS detection mode was chosen and the conditions were carefully optimized to improve the selectivity and sensitivity of PAH determinations. A parent ion was chosen for each compound by taking into account their m/z and their relative abundance (both as high as possible) in order to increase sensitivity. The optimization of the excitation amplitude voltage for each PAH was carried out using the automated method development option included in the MS/MS software tool kit. The optimum valued for this parameter was reached when the secondary spectrum showed multiple and intense product ions while the parent ion intensity remained at around 10%. The effect the CID amplitude was studied in the resonant and non-resonant modes for every compound. Poor fragmentation was obtained in non-resonant mode and the resonant waveform type was required for obtaining a suitable dissociation of the PAHs. Optimized MS/MS conditions for each target compound are detailed in Table 2.

3.2. Optimization of conditions for SPLE

To achieve fast and efficient extraction of analytes from solid matrices using PLE, proper operational parameters (sample preparation, temperature, pressure, extraction time, number of cycles and flush volume) and an appropriate extraction solvent or mixture solvents, with polarities closely matching that of the target compounds, should be selected. Thus, the effect of the different extraction

parameters on the extraction efficiency was evaluated to obtain optimal extraction conditions for PAHs from sewage sludge samples.

3.2.1. Sample treatment optimization

Sample preparation is an essential part of every solvent-based extraction procedure. While many sample types can be efficiently extracted without any pretreatment, other samples require some manipulation for an efficient extraction to occur. The effect of sample matrix depends on sample composition. Solid environmental samples, such as sewage sludge, sediments or soils, can differ significantly in their physical-chemical properties, type of compounds present or particles size. These parameters affect the sorption and retention of analytes [21].

On the other hand, the complexity of an analytical procedure increases with the number of organic compounds present in the sample. Thus, sewage sludge is often regarded as one of the worst environmental matrices to extract as it can contain high concentrations of organic chemicals and their degradation products as well as high amounts of organic matter. In order to solubilize the analytes during the extraction, proper conditions should be used to overcome the interactions between the organic fraction and target compounds. This often results in dirty extracts that present large concentrations of co-extracted substances and require extensive clean-up steps before the final analysis. In-depth clean-up of extracts prior to chromatographic analysis can be avoided by performing an in situ clean-up step by adding certain sorbents to the PLE cells. In this way, lipids and other coextractable materials are prevented from coming out to the extract.

To the best of our knowledge, the application of PLE with in-cell clean-up to the determination of PAHs in sewage sludge has only been reported by Trably et al. [8]. This method involves the extraction of 14 PAHs at 120 °C using a hexane-acetone (50:50, v/v) mixture as extraction solvent and 1 g of alumina as clean-up sorbent inside cell.

The first extraction assays were carried out using the previously reported PLE with in-cell clean-up method [8] but dark-coloured extracts resulted with high residues after solvent evaporation (Table 3). Therefore, the sample extracts were not clean enough for direct injection in the chromatographic systems (HPLC-Flu and GC-MS/MS).

Unsatisfactory results obtained in preliminary assays suggested that very complex sewage sludge samples can require some treatment before extraction by PLE. In some applications, the sample is mixed and dispersed with solid sorbents before loading it in the PLE cell. De la Cal et al. [33] described a SPLE method for the analysis of polybrominated diphenyl ethers congeners in sediment samples. Spiked samples were ground with alumina and cooper (1:2:2) and the mixture was loaded into the extraction cell on top of alumina. Later Losada et al. [34] reported a SPLE method for polybrominated diphenyl ethers in fish. The sample was mixed with Na_2SO_4 at a fish Na_2SO_4 ratio of 1:20 in a mortar until a homogeneous mixture was obtained. The mixture was loaded into the cell on top of 20 g of Florisil. Consequently, a second series of experiments were performed including a sample dispersion stage. Although the dispersion and the clean-up sorbents were adapted from an optimized MSPD procedure for sewage sludge, developed in our laboratory [16], a series of experiments were carried out to assess the effect of additive (KOH (MeOH) sat.) and Na_2SO_4 on the yield and selectivity of the PLE process. Previous studies showed that these parameters were important in terms of minimizing extract residues and maximizing recoveries of PAHs [14, 16]. Therefore, different volumes of additive (0, 0.5, 1, 1.5 mL) as well as amounts of Na_2SO_4 (0.5, 1, 1.5 and 2 g) were tested to achieve the optimal conditions. The obtained results were in good agreement with those obtained in the previous studies. As expected, the alkali treatment has a strong positive effect. Recoveries increased and the residue amounts decreased as the amount of alkali increased (Table 3). The recoveries obtained with 0.5 mL of KOH (MeOH) sat. were on average 10-40% lower than with 1 mL of additive. With regard to the amount of Na_2SO_4 , it is interesting to mention that it is closely related with the amount of additive. As can be seen in Table 3, 0.5 g of Na_2SO_4 was enough to provide good recoveries when 1 mL of alkali was added in the blending stage. However, an increasing of alkali to 1.5 mL required 1.5 g of Na_2SO_4 to achieve good results in terms of recovery.

In summary, the sample preparation was demonstrated be a critical step in the determination of PAHs from complex matrices. The sample treatment enhances the yield of extraction and provides the additional advantage of decreasing the amount of co-extracted substances, producing directly analysable extracts by HPLC-Flu and GC-MS/MS. Therefore, the sample was dispersed in a glass mortar by using 1 mL of KOH (MeOH) sat. as additive and 1 g of Florisil and 0.5 g of Na_2SO_4 . Two filters and a layer of sand were placed at the end of the PLE cell. Then, the

clean-up sorbents (1 g of Florisil followed by 2 g of silica) were introduced into the cell, followed by the dispersed sample. Finally, the remaining free space of the cell was filled up with sand to minimize cell void volume. These conditions were employed in all subsequent experiments.

Table 3 Amount of residue in sewage sludge extracts and values of recovery of analytes obtained by different SPLE conditions.

Sample	Sample treatment conditions		PLE conditions ^b		Results	
	Dispersant	Type of additive ^a	Extraction solvent	T ^a , flush volume	Residue (mg g ⁻¹) ^c	Recoveries (%) ^d
Pooled sample	1 g Flo + 0.5 g Na ₂ SO ₄	1 mL KOH	DCM-MeOH	---	22 ± 1	97 [16] ^e
		0.5 mL KOH	Hex	100 °C, 50%	13 ± 3	78
		1 mL KOH	Hex	100 °C, 50%	16 ± 3	95
		1 mL KOH	Hex	120 °C, 50%	18 ± 2	98
		1 mL MeOH	Hex	120 °C, 50%	29 ± 1	84
		---	Hex-Ace	100 °C, 50%	40 ± 2	78
		0.5 mL KOH	Hex-Ace	100 °C, 50%	32 ± 3	88
		1 mL KOH	Hex-Ace	100 °C, 50%	26 ± 1	96
		1 mL KOH	Hex-Ace	120 °C, 50%	27 ± 1	99
	---	---	Hex-Ace	120 °C, 60% ^f	79 ± 5	82 [8]
BCR088	1 g Flo + 0.5 g Na ₂ SO ₄	1 mL KOH	DCM-MeOH	---	20 ± 1	99 [16] ^e
	1 g Flo + 0.5 g Na ₂ SO ₄	1 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	21 ± 1	88
	1 g Flo + 1 g Na ₂ SO ₄	1 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	22 ± 1	83
	1 g Flo + 0.75 g Na ₂ SO ₄	1.5 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	20 ± 2	70
	1 g Flo + 1 g Na ₂ SO ₄	1.5 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	22 ± 1	73
	1 g Flo + 1.5 g Na ₂ SO ₄	1.5 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	24 ± 1	84
	1 g Flo + 2 g Na ₂ SO ₄	1.5 mL KOH	Hex	120 °C, 70%	23 ± 1	79
	1 g Flo + 0.5 g Na ₂ SO ₄	1 mL KOH	Hex	140 °C, 100%	24 ± 1	99

0.2 g of sample. Data for three replicates. Flo, Florisil; Na₂SO₄, anhydrous sodium sulphate; KOH, saturated methanolic potassium hydroxide solution; MeOH, methanol; DCM-MeOH, dichloromethane-methanol (90:10, v/v) mixture; Hex, n-hexane; Hex-Ace, hexane-acetone (50:50, v/v) mixture; (---) not employed. ^a Amounts of solvent or saturated methanolic potassium hydroxide solution added in the blending step. ^b Remaining PLE operational parameters were in all experiments 1500 psi, 1 static cycle of 5 min and 60 s of purge. ^c Average (mg g⁻¹ sample) of three determinations ± standard deviation. ^d Average of PAHs recoveries, calculated considering values obtained with MSPD procedure [16]. ^e Recoveries calculated considering values obtained with MAE procedure [14]. ^f Cell, 1 g alumina followed by 0.5 g of sample and 1.5 g of diatomaceous earth, PLE conditions, 1500 psi, 2 cycles of 5 min and 60 s of purge.

3.2.2. Solvent extraction choice

Optimization of the extraction process generally begins with an appropriate choice of the extraction solvent. The extraction of solid environmental samples, which consist of complex mixtures of different species at different concentration levels, is a complicated task. At elevated temperature and pressure, the extraction process proceeds faster, but the selectivity decreases, because the analytes are not the only compounds solubilized. Therefore, the extraction solvent must be able to solubilize the analytes of interest, minimizing the co-extraction of other matrix components. Consequently, the polarity of the extraction solvent should closely match that of the target compounds. It is also important to take into account the compatibility with the later treatment steps as well as the volatility of solvent if extract concentration is necessary.

In this study, extraction solvents were chosen on the basis of those employed in previously reported methodologies for the determination of PAHs from environmental matrices (sewage sludge and soil) [14, 16, 35]. Thus, a series of experiments were performed in order to evaluate the extraction capability of n-hexane, a hexane-acetone (50:50, v/v) mixture and a dichloromethane-methanol (95:5, v/v) mixture. As can be seen in Fig. 1, the dichloromethane-methanol (95:5, v/v) mixture provided better recovery values than n-hexane and hexane-acetone (50:50, v/v). However, this mixture provided extra interferences, as evidenced by yellow extracts with larger residue obtained after solvent evaporation. Experimental data did not show significant differences between n-hexane and the hexane-acetone (50:50, v/v) mixture in terms of recovery. However, lower sample matrix residues were found when n-hexane was used as extraction solvent; therefore, n-hexane was chosen and used in further experiments.

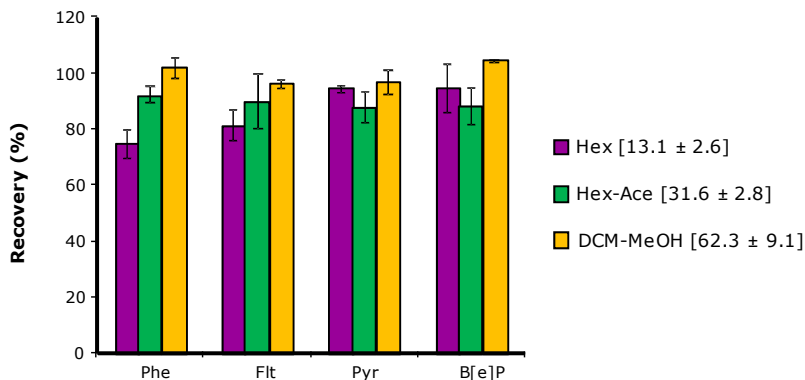


Fig. 1 Recoveries of some representative PAHs in pooled sewage sludge sample with different extraction solvents, during the optimization step. PLE conditions were 100 °C, one cycle of 5 min. and 50% of flush volume. Hex, n-hexane; Hex-Ace, hexane-acetone (50:50, v/v) mixture, DCM-MeOH, dichloromethane-methanol (95:5, v/v) mixture. Values in brackets correspond to residues (average (mg g⁻¹ sample) ± standard deviation (n=3)) of pooled sewage sludge extracts. Data for triplicate extraction.

3.2.3. Optimization of SPLE parameters

Once the sample treatment conditions and the solvent extraction were established, initial experiments were carried out in order to evaluate the effect of the pressure on the extraction efficiency of SPLE. The application of high pressure allows maintain the solvent in the liquid state while above their atmospheric boiling points. Furthermore, the use of high pressures facilitates extraction of analytes that have been trapped in matrix pores since the pressure forces the solvent into areas of the matrices that would not normally be contacted by solvent using atmospheric conditions [20, 21]. Pooled sample of sewage sludge was extracted at 1500 and 1700 psi. The obtained results showed that an increase in the extraction pressure had no significant improvement in the extraction efficiencies, data not shown. In agreement with previously published results [20, 28] for PLE, pressure was found to play no role other than to keep the extraction solvent liquid at the high temperatures used. Therefore, an extraction pressure of 1500 psi was chosen and used in further experiments.

The purge time controls the period during which nitrogen is passing through the stainless steel cell to sweep away all the solvent wetting the sample and the cell filling, at the end of the static extraction cycle. Purge time was set at default

value (60 s) since it is not considered an important factor in the optimization of a PLE method.

Temperature is one of the most important parameter in PLE extraction. The use of solvents at elevated temperatures should give enhanced performance as compared to extraction to near room temperatures since the use of higher temperatures increases the capacity of solvents to solubilize analytes and increases the diffusion rate. In addition, increased temperatures also decrease the viscosity of liquid solvent (better penetration in matrix particles) and can disrupt the strong analyte-matrix interactions caused by van der Waals forces, hydrogen bonding, and dipole attractions of the analyte molecules and active sites of the matrix [20].

Initial experiments were performed at the extraction temperature recommended by Dionex [36] as starting point for all environmental applications (100 °C), but unsatisfactory results were obtained. Therefore, in order to achieve efficient extraction of target compounds, higher extraction temperatures (120, 140 and 160 °C) were tested. As expected, higher temperatures resulted in better extraction efficiency for the studied PAHs. The recovery values increased when the extraction temperature was increased from 120 °C to 140 °C. However, a higher temperature (160 °C) did not result in significantly higher extraction efficiency (data not shown). Therefore, 140 °C was chosen as the optimum extraction temperature.

Another experimental parameter investigated was the amount of solvent necessary to obtain complete extraction. The flush volume (referred as a percentage of the cell volume: 11 mL) divided by the number of cycles determines the amount of fresh solvent added between each extraction cycle. The flush volume may have a significant effect on recovery, especially during extraction where the PLE cells are packed with a stationary phase, as this may increase retention of the analytes.

In order to evaluate the influence of solvent volume on the yield of SPLE process, different percentages of flush volume were tested. The first experiments were carried out without adding fresh solvent in the PLE cell. Unsatisfactory results suggest that a very complex matrix such as sewage sludge requires higher percentages of flush volume to achieve an efficient extraction of PAHs. Then, a series of experiments were performed employing a 50% of flush volume (5.5 mL).

The results showed that the flush volume was important in terms of maximizing recoveries of PAHs, since the recovery values were on average 20-30% lower when fresh solvent was not added; data not shown. Anyway, unsatisfactory results were also obtained when a percentage of 50% was used.

Consequently, higher percentages of flush volume (70% and 100%) were assayed. The results (Fig. 2) demonstrated that the recoveries of low molecular weight PAHs were unaffected by the increasing of flush volume. In contrast, increasing the flush volume from 70% to 100% significantly increases the recovery of high molecular weight PAHs. Therefore, a flush volume of 100% was chosen for the method and used in further experiments.

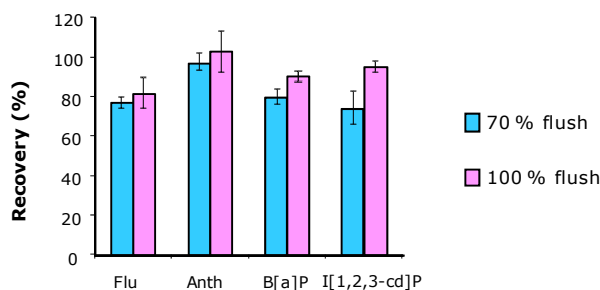


Fig. 2 Effect of the flush volume on the efficiency of the PLE extraction for some representative PAHs in BCR088. PLE conditions were 140 °C, one cycle of 5 min and n-hexane as extraction solvent. Data for triplicate extraction.

The extraction process in PLE can be conducted in a static or dynamic mode. Although dynamic mode improves mass transfer, this type of extraction is rarely used, mainly because of higher solvent consumption compared with the static process. The static process begins with heating the cell with the sample to an appropriate temperature during the equilibration time and is followed by a so-called static extraction process. During this process, the analytes are isolated from the sample under static conditions. The static process can be repeated several times by using static cycles if low recoveries are obtained in a single stage. Thus, the use of static cycles was developed to introduce fresh solvent during the extraction process, which helps to maintain favourable extraction equilibrium [21]. Obviously, parameters such as number of static cycles and static time can affect to efficiency of PLE process and therefore these must be carefully evaluated.

The effect of static time was explored in conjunction with static cycles, in order to produce a complete extraction in the most efficient way possible. A series of experiments were performed with different static times and extraction cycles (1 cycle of 5 min, 2 cycles of 5 min, 2 cycles of 3 min and 3 cycles of 3 min). No significant differences were observed between one cycle of 5 min and two cycles of 5 min. However, recoveries slightly lower were obtained with two cycles of 3 min. In accordance with the results, a single static cycle of 5 min was considered able to obtain quantitative recoveries, which is advantageous in terms of extraction duration.

3.3. Performance of the analytical procedure

Calibration curves were prepared at six levels and each calibration level was injected in triplicate. The range of concentrations and other calibration figures of merit, as well as the detection (LOD, $S/N=3$) and quantification (LOQ, $S/N=10$) limits for the overall proposed method are summarized in Table 4. HPLC-Flu was demonstrated to be more sensitive than the optimized GC-MS/MS technique for the determination of PAHs but it should be stressed that all the analytes were quantified far below the limit imposed by current regulations [11] with both proposed chromatographic techniques. Fig. 3 displays the HPLC-Flu and GC-MS/MS ion extracted chromatograms for a standard mixture solution.

Intermediate precision was assessed by series of independent experiments carried out on different days with spiked and non-spiked pooled sewage sludge samples. Average concentrations (on a dry mass basis) and precision between days are reported in Table 4.

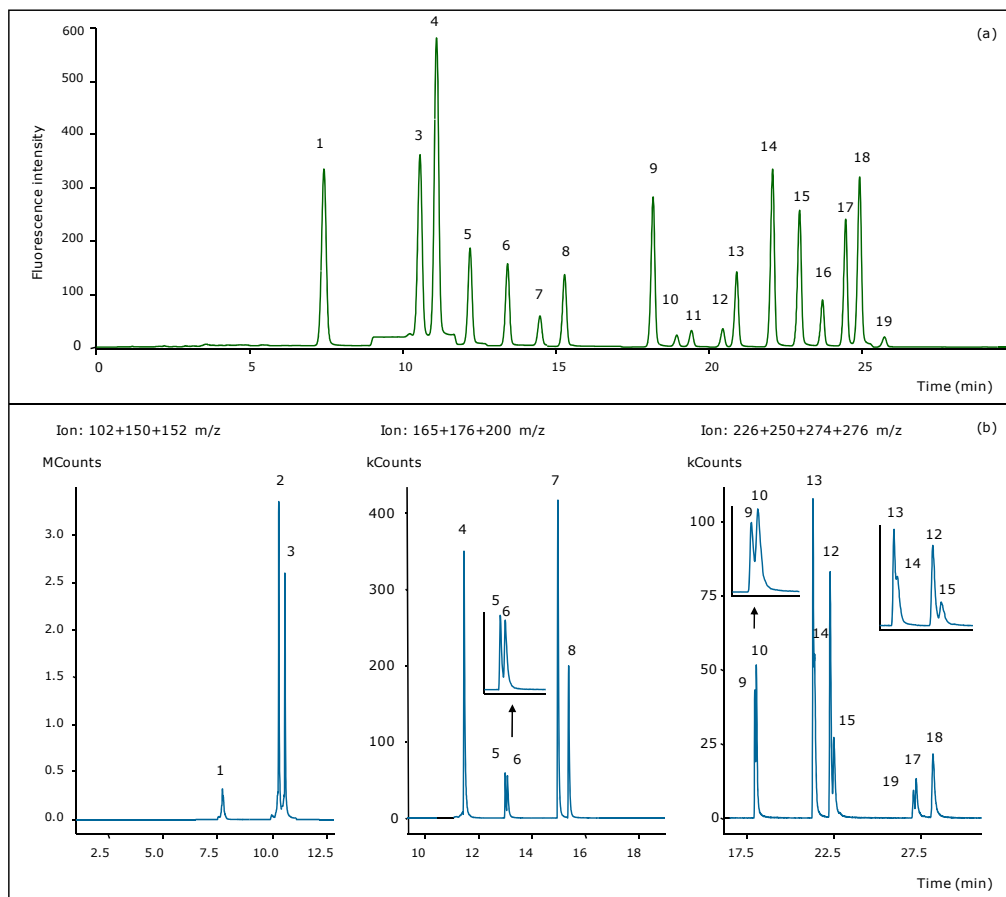


Fig. 3 HPLC-Flu (a) and PTV-LVI-GC-MS/MS extracted ion (b) chromatograms for a standard solution of studied PAHs at concentrations between 20 and 400 $\mu\text{g L}^{-1}$. Peak assignment: (1) Naph, (2) Acy, (3) Ace, (4) Flu, (5) Phen, (6) Anth, (7) Flt, (8) Pyr, (9) B[a]A, (10) Chry, (11) 5-MC, (12) B[e]P, (13) B[b]F, (14) B[k]F, (15) B[a]P, (16) DB[a]P, (17) DB[ah]A, (18) B[ghi]P and (19) I[1,2,3-cd]P.

Table 4 Linearity, reproducibility, recoveries, LODs and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	PTV-LVI-GC-MS/MS						HPLC-Flu						Recovery ± R.S.D. (%) ^b
	Linearity	Reproducibility ^a µg g ⁻¹ ± R.S.D (%)			LOQ ^a S/N=3 (µg g ⁻¹)	LOQ ^a S/N=10 (µg g ⁻¹)	Linearity	Reproducibility ^a µg g ⁻¹ ± R.S.D (%)			LOQ ^a S/N=3 (µg g ⁻¹)	LOQ ^a S/N=10 (µg g ⁻¹)	
		R ²	Pool ^c	Spiked pool ^c				R ²	Pool ^c	Spiked pool ^c			
Naph	10-400	0.9995	0.2 ± 4.4	0.6 ± 6.5	0.03	0.09	1-200	0.9995	0.09 ± 3.1	0.5 ± 6.7	0.0004	0.001	85.2 ± 1.3
Acy	20-800	0.9992	0.2 ± 5.5	4.0 ± 5.8	0.008	0.03							90.8 ± 1.1
Ace	10-400	0.9998	0.1 ± 2.6	0.8 ± 1.6	0.02	0.08	1-200	0.9997	0.09 ± 5.5	0.7 ± 6.1	0.002	0.005	90.0 ± 1.1
Flu	2-80	0.9990	0.2 ± 2.9	0.8 ± 13.7	0.01	0.04	0.2-40	0.9997	0.2 ± 2.0	0.5 ± 3.4	0.0002	0.0005	84.8 ± 1.0
Phe	1-40	0.9979	1.8 ± 3.9	4.9 ± 1.2	0.01	0.04	0.1-20	0.9995	1.6 ± 2.9	3.4 ± 1.8	0.0008	0.0003	90.6 ± 1.4
Anth	1-40	0.9997	0.1 ± 4.6	0.3 ± 2.1	0.01	0.05	0.1-20	0.9994	0.08 ± 1.3	0.3 ± 9.1	0.0001	0.0004	97.5 ± 1.7
Flt	2-40	0.9992	0.5 ± 4.0	1.3 ± 4.4	0.004	0.01	0.2-40	0.9997	0.5 ± 0.1	1.2 ± 4.2	0.0006	0.002	100.2 ± 0.4
Pyr	1-40	0.9993	0.5 ± 1.7	1.2 ± 3.9	0.005	0.02	0.1-20	0.9996	0.5 ± 4.7	1.1 ± 2.1	0.0001	0.0003	98.6 ± 1.5
B[a]A	1-20	0.9989	0.09 ± 6.8	0.3 ± 4.1	0.01	0.05	0.1-20	0.9997	0.07 ± 2.9	0.3 ± 2.4	0.0004	0.0001	99.9 ± 1.6
Chry	1-20	0.9993	n.d	2.2 ± 3.1	0.01	0.04	0.1-20	0.9998	n.d	2.2 ± 2.1	0.0001	0.0004	105.5 ± 1.3
5-MC							0.1-20	0.9997	n.d	n.d ^b	0.0001	0.0003	100.0 ± 0.2
B[a]P	2-80	0.9971	0.2 ± 10.8	0.6 ± 4.5	0.01	0.04	0.2-40	0.9993	0.3 ± 1.2	0.8 ± 5.0	0.0006	0.002	95.1 ± 1.1
B[b]F	2-80	0.9976	0.09 ± 11.1	0.6 ± 3.6	0.02	0.06	0.2-40	0.9998	0.08 ± 2.5	0.5 ± 8.1	0.0002	0.001	102.7 ± 1.7
B[k]F	1-40	0.9994	0.06 ± 11.8	0.4 ± 5.1	0.02	0.06	0.1-20	0.9994	0.02 ± 5.5	0.3 ± 3.7	0.0003	0.0001	100.3 ± 1.5
B[a]P	1-40	0.9979	0.04 ± 7.9	0.3 ± 7.3	0.04	0.1	0.1-20	0.9992	0.04 ± 7.8	0.3 ± 2.6	0.0004	0.0001	99.3 ± 1.6
DB[a]P							0.1-20	0.9991	n.d	0.04 ± 5.9	0.0001	0.0004	97.0 ± 1.5
DB[an]A	2-80	0.9985	n.d	0.4 ± 4.6	0.005	0.02	0.2-40	0.9997	0.01 ± 11.2	0.4 ± 6.8	0.0007	0.0002	105.2 ± 0.7
B[ghi]P	2-80	0.9992	0.06 ± 4.2	0.2 ± 2.5	0.07	0.2	0.2-40	0.9995	0.06 ± 8.7	0.2 ± 4.1	0.0006	0.0002	106.6 ± 1.5
I[123-cd]P	2-40	0.9969	0.03 ± 3.1	0.1 ± 3.7	0.03	0.09	0.1-20	0.9998	0.03 ± 3.9	0.1 ± 8.0	0.0004	0.001	97.4 ± 1.5

Calibration: calibration range; R²: determination coefficient; LODs and LOQs corresponding to overall analytical procedure; n.d., not detected. ^a Concentration on dry weight basis. ^b Spiked certified reference material (BCR088). ^c n = 3 replicates. ^d n = 7 replicates. ^e Acy was not analyzed by HPLC-Flu. ^f Recovery determined by GC-MS/MS. ^g Compounds not investigated by GC-MS/MS. ^h Pooled sewage sludge sample was not spiked with 5-MC.

Recoveries were evaluated by processing sewage sludge samples with standard additions at concentrations ca. 0.5, 1, 1.5 and 2 times the actual concentrations in original samples. SPLE extracts can be directly analyzed by GC-MS/MS whereas solvent evaporation stages are required in order to achieve extracts that can be injected in the HPLC system. Significant losses of some PAHs are produced during the solvent evaporation stages associated with sample preparation procedure. In the proposed SPLE method, the solvent evaporation step provides overall losses values ranged from 1% to 24%. Recoveries for the overall analytical process were calculated from the slope of the addition graph and the values of losses in the solvent evaporation process were taken into consideration for recovery calculation. The extraction process was highly efficient, with recoveries higher than 85% and relative standard deviations lower than 2% (Table 4). The combination of elevated temperatures and pressures allowed to obtain high recoveries of target compounds using a low polar solvent (n-hexane), providing clean extracts not only to analyze by HPLC-Flu but also by GC-MS/MS. Thus, the use of n-hexane as extraction solvent presented an improved selectivity versus the use of more polar solvents. Moreover, the developed SPLE procedure offers important advantages since avoids the use of highly toxic chlorinated solvents, requires a low consumption of solvent and allows automated extraction process.

To check the performance of the analytical procedure, seven replicates of BCR088 (certified sludge) and RTC-CNS312-04 (reference sludge) were processed by the described procedure obtaining good agreement between the results and the certified and/or reference values (see Table 5 for mean concentrations and confidence intervals). Fig. 4 depicts typical chromatograms obtained by HPLC-Flu and PTV-LVI-GC-MS/MS for reference sludge (RTC-CNS312-04) working in the optimal conditions described.

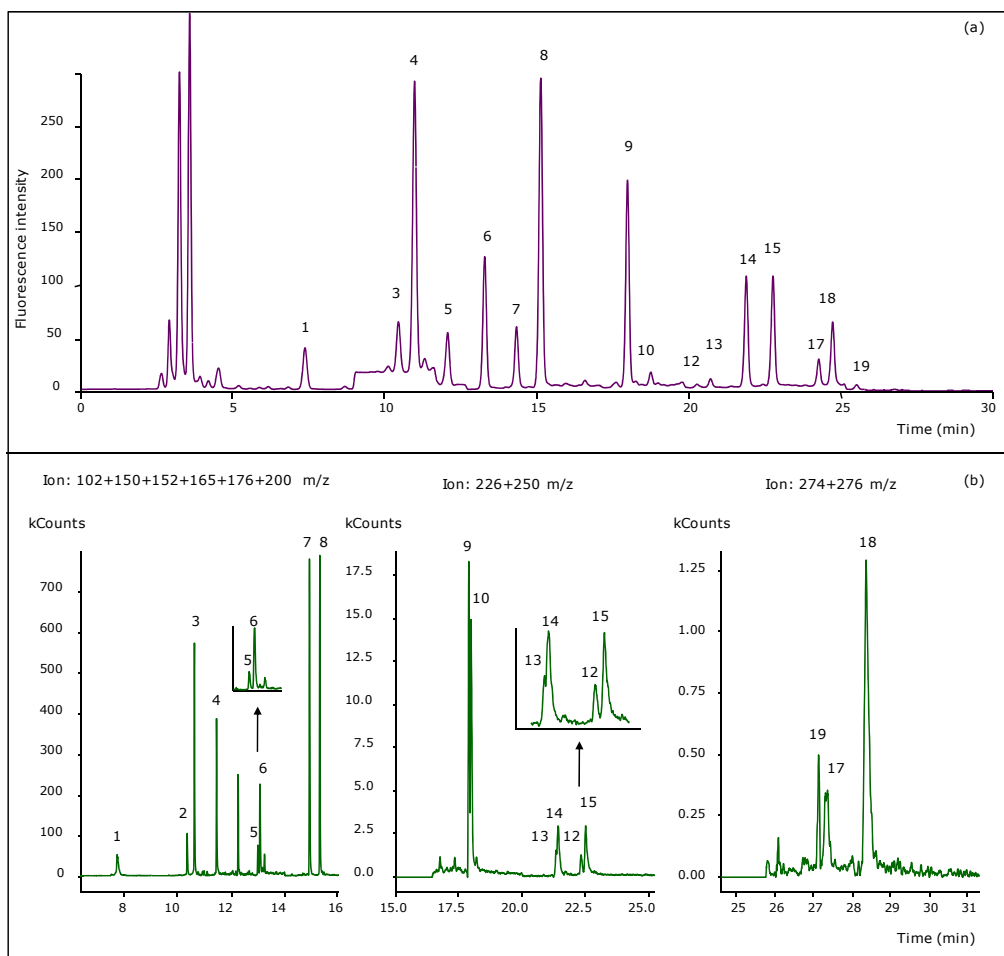


Fig. 4 Chromatograms obtained by (a) HPLC-Flu and (b) PTV-LVI-GC-MS/MS, corresponding to reference material (RTC-CNS312-04) extracts. Peak assignments as in Fig. 3.

Table 5 Measured concentrations and confidence intervals vs. certified and reference values in BCR088 and RTC-CNS312-04.

BCR088			RTC-CNS312-04			
Compound	Certified values (µg g ⁻¹)	Measured (µg g ⁻¹) X ± 2SD (n=7)	Measured (µg g ⁻¹) X ± 2SD (n=4)	Reference values (µg g ⁻¹)	Measured (µg g ⁻¹) X ± 2SD (n=7)	Measured (µg g ⁻¹) X ± 2SD (n=4)
		HPLC-Flu	PTV-LVI-GC-MS/MS		HPLC-Flu	PTV-LVI-GC-MS/MS
Naph				2.58 ± 0.53	3.10 ± 0.39	2.94 ± 0.44
Acy ^a				2.42 ± 0.53		2.50 ± 0.63
Ace				2.99 ± 0.46	3.42 ± 0.36	3.29 ± 0.67
Flu				2.01 ± 0.32	2.31 ± 0.06	2.27 ± 0.25
Phe				0.46 ± 0.11	0.56 ± 0.07	0.56 ± 0.03
Anth				1.67 ± 0.27	1.89 ± 0.09	1.57 ± 0.36
Flt				4.19 ± 0.57	4.66 ± 0.15	3.94 ± 0.33
Pyr	2.16 ± 0.09	2.09 ± 0.14	2.12 ± 0.10	4.17 ± 0.51	4.43 ± 0.73	4.56 ± 0.14
B[a]A	0.93 ± 0.09	0.86 ± 0.06	0.91 ± 0.14	1.45 ± 0.18	1.45 ± 0.20	1.53 ± 0.26
Chry				1.12 ± 0.15	1.22 ± 0.11	1.17 ± 0.12
B[e]P	1.02 ± 0.07	1.11 ± 0.09	1.04 ± 0.11			
B[b]F	1.17 ± 0.08	1.12 ± 0.11	1.21 ± 0.09	0.24 ± 0.05	0.28 ± 0.03	0.25 ± 0.06
B[k]F	0.57 ± 0.05	0.53 ± 0.04	0.55 ± 0.01	0.68 ± 0.09	0.68 ± 0.07	0.60 ± 0.01
B[a]P	0.91 ± 0.09	0.86 ± 0.07	0.84 ± 0.08	0.87 ± 0.12	0.90 ± 0.09	0.77 ± 0.03
DB[ah]A				0.41 ± 0.07	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.05
B[ghi]P				0.84 ± 0.17	0.79 ± 0.09	0.69 ± 0.07
I[1,2,3-cd]P	0.81 ± 0.06	0.81 ± 0.05	0.85 ± 0.11	0.54 ± 0.12	0.55 ± 0.04	0.43 ± 0.01

Concentrations in dry weight basis. ^a Acy was not analyzed by HPLC-Flu

The applicability of the proposed SPLE method was tested by determination of PAHs in several sewage sludge samples. All samples were also processed by two alternative techniques using MAE [14] and MSPD [16], with good agreement between the sample preparation techniques. Total concentrations between 1.1 and 479.6 $\mu\text{g g}^{-1}$ were found in sewage sludge samples. As can be seen in Table 6, two samples (S5 and S6, coming from highly industrialized areas) exhibited high contents of PAHs, exceeding the EU legal limit for the sum of selected PAHs. The PAHs levels in the remaining samples were below the maximum allowed concentrations.

Table 6 Concentration of PAHs found in different sewage sludge samples by PLE-HPLC-Flu.

Compound	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Naph	0.15 \pm 0.8	---	0.3 \pm 2.7	4.2 \pm 2.9	7.6 \pm 4.1	90.7 \pm 3.1
Ace	n.d	0.2 \pm 0.5	n.d	0.5 \pm 5.5	0.8 \pm 2.4	17.6 \pm 4.6
Flu	0.05 \pm 8.7	0.4 \pm 6.8	0.09 \pm 2.6	0.4 \pm 0.9	2.2 \pm 6.1	43.1 \pm 4.0
Phe	0.25 \pm 6.1	4.1 \pm 0.9	0.5 \pm 3.6	1.8 \pm 6.2	14.9 \pm 3.4	207.0 \pm 6.3
Anth	0.01 \pm 2.9	0.2 \pm 4.6	0.02 \pm 3.0	0.1 \pm 3.7	0.5 \pm 5.1	3.9 \pm 7.8
Flt	0.20 \pm 7.4	n.d	0.3 \pm 0.7	0.7 \pm 1.9	7.2 \pm 3.9	87.2 \pm 4.8
Pyr	0.20 \pm 8.4	1.1 \pm 1.3	0.2 \pm 1.6	0.4 \pm 0.6	4.3 \pm 4.0	29.8 \pm 4.9
B[a]A	0.02 \pm 2.5	0.1 \pm 1.1	0.03 \pm 2.1	0.04 \pm 3.0	0.1 \pm 1.8	0.3 \pm 5.2
Chry	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
5-MC	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B[e]P	0.08 \pm 4.0	0.6 \pm 1.1	0.1 \pm 11.5	n.d	n.d	n.d
B[b]F	0.04 \pm 2.5	0.1 \pm 1.7	0.05 \pm 2.2	0.1 \pm 4.0	n.d	n.d
B[k]F	0.01 \pm 6.7	0.03 \pm 11.0	0.02 \pm 7.1	0.03 \pm 6.8	n.d	n.d
B[a]P	0.03 \pm 4.0	0.1 \pm 9.6	0.03 \pm 5.4	0.03 \pm 8.6	n.d	n.d
DB[a]P	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
DB[ah]A	0.003 \pm 2.5	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d
B[ghi]P	0.05 \pm 4.1	0.1 \pm 4.2	0.04 \pm 2.8	0.04 \pm 4.2	n.d	n.d
I[1,2,3-cd]P	0.02 \pm 1.9	0.05 \pm 3.5	0.03 \pm 1.9	0.03 \pm 5.6	n.d	n.d
ΣPAHs leg	0.9	6.0	1.3	4.0	29.3	384.6
ΣPAHs	1.1	7.1	1.8	8.4	37.5	479.6

Average ($\mu\text{g g}^{-1}$) \pm relative standard deviation (RSD, %); concentration on dry weight basis; n=3 replicates per sample; n.d., not detected; (-), not available; Σ PAHs leg, sum of PAHs considered in EU legislation; Σ PAHs, sum of PAHs considered in this study.

The optimized SPLE procedure appears to be an advantageous alternative, being fast (one single static cycle of 5 min is employed) and simple, avoiding use of

chlorinated solvents, using low volumes of organic solvents and requiring small amounts of sample.

4. CONCLUSIONS

A new SPLE process has been developed and validated for the first time for the determination of 19 PAHs in complex sewage sludge matrices. Extraction conditions were carefully selected to achieve maximal recovery of PAHs contained in sewage sludge while eliminating most of the interfering matrix components. Sample treatment combined with the use of solid sorbents in the extraction cell allowed obtaining a directly analyzable extract. Another advantage of the proposed methodology is that most of the steps involved in the sample preparation procedure are performed automatically and up to 24 samples can be processed sequentially and unattended. Combining the efficiency with the automation of PLE significant improvements in the PAHs analysis throughput can be attained.

A PTV injection method was optimized for the GC-MS/MS analysis of PAHs. PTV injections offers the possibility of introducing large volumes of sample into the GC system, which improves the sensitivity, detection and quantification limits with respect to those obtained by conventional split/splitless injection. Thus, sewage sludge extracts obtained using the developed SPLE procedure were successfully analyzed by the optimized PTV-LVI-GC-MS/MS method and HPLC-Flu.

In summary, the developed methodology shows good performance, providing good recoveries for all studied compounds and allows the determination of PAHs in the low "microgram per kilogram" range in a reproducible and simple way. The proposed methodology appears to be a sensitive, selective and reliable analytical method, suitable to high throughput monitoring the PAHs concentrations in sewage sludge as established by the EU Regulations.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project CTQ2006-03334/BQU), E.U. FEDER funding and the Xunta de Galicia (project PGIDIT06PXIB237039PR). T. Pena gratefully acknowledges her FPI contract from the Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

- [1] L. Bontoux, M. Vega, D. Papameletiou, 1998. Urban wastewater treatment in Europe: what about the sludge? IPTS Report, pp. 5-14.
- [2] I. Aparicio, J.L. Santos, E. Alonso, Waste Manage. 29 (2009) 1747.
- [3] E. Erikson, N. Christensen, J.E. Schmidt, A. Ledin, Desalination 226 (2008) 371.
- [4] E.Z. Harrison, S.R. Oakes, M. Hysell, A. Hay, Sci. Total Environ. 367 (2006) 481.
- [5] R. Duarte-Davidson, K.C. Jones, Sci Total Environ. 185 (1996) 59.
- [6] S.C. Wilson, R. Duarte-Davidson, K.C. Jones, Sci. Total Environ. 185 (1996) 45.
- [7] C.A. Menzie, B.B. Potocki, J. Santodonato, Environ. Sci. Technol., 26 (1992) 1278.
- [8] E. Trably, N. Delgènes, D. Patureau, J.P. Delgènes, Intern. J. Environ. Anal. Chem. 84 (2004) 995.
- [9] S. Pérez, M. Guillamón, D. Barceló, J. Chromatogr. A 938 (2001) 57.
- [10] H.R. Rogers, Sci. Total Environ. 185 (1996) 3.
- [11] Council of the European Community, 27 April, 2000. Working document on Sludge, 3rd Draft, Brussels.
- [12] M.I.H. Helaleh, A. Al-Omair, A. Nisar, B. Gevao, J. Chromatogr. A 1083 (2005) 153.
- [13] V. Flotron, J. Houessou, A. Bosio, C. Delteil, A. Bermond, V. Camel, J. Chromatogr. A 999 (2003) 175.
- [14] M.T. Pena, L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2559.
- [15] J.D. Berset, R. Holzer, J. Chromatogr. A 852 (1999) 545.
- [16] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, Anal. Chim. Acta 626 (2008) 155.

- [17] C. Miège, J. Dugay, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 995 (2003) 87.
- [18] P. Oleszczuk, S. Baran, J. Hazard. Mat. B 113 (2004) 237.
- [19] C. Miège, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay, V. Pichon, M.C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 859 (1999) 29.
- [20] B.E. Richter, B.A. Jones, J.L. Ezzel, N.L. Porter, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1033.
- [21] H. Giergielewicz-Mozajska, L. Dabrowski, J. Namiesnik, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 149.
- [22] M.M. Schantz, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 1043.
- [23] P. Canosa, D. Pérez-Palacios, A. Garrido-López, M.T. Tena, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 105.
- [24] M. García-López, I. Rodríguez, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6986.
- [25] J. Radjenovic, A. Jelic, M. Petrovic, D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 1685.
- [26] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, *Anal. Chim. Acta* 602 (2007) 211.
- [27] V. Fernández-González, E. Concha-Graña, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, *J. Chromatogr. A* 1196-1197 (2008) 65.
- [28] N. Alexandrou, M. Smith, R. Park, K. Lumb, K. Brice, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 81 (2001) 257.
- [29] N. Ratola, S. Lacorte, A. Alves, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1114 (2006) 198.
- [30] V. Yusà, O. Pardo, P. Martí, A. Pastor, *Food Addit. Contam.* 22 (2005) 482.
- [31] P. Manirakiza, A. Covaci, P. Schepens, *J. Food Comp. Anal.* 14 (2001) 93.
- [32] C. Feigel, GC/MS Varian Application Note 45, GC/MS/MS analysis of PAH's in water using large volume injections, Varian Chromatography Systems, Walnut Creek, CA, USA. Available in www.varianinc.com.
- [33] A. de la Cal, E. Eljarrat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 165.

- [34] S. Losada, F.J. Santos, M.T. Galcerán, *Talanta* 80 (2009) 839.
- [35] M.T. Pena, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 1165 (2007) 32.
- [36] Dionex Application Note ASE 208, Methods optimization in accelerated solvent extraction, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA, 2004. Available in www.dionex.com.

1.2.6. CONSIDERACIONES ADICIONALES Y CONCLUSIONES

A lo largo del **Capítulo 1.2**, se han expuesto los resultados obtenidos en el desarrollo de varias metodologías para el análisis de PAHs en muestras de lodo y suelo, mediante HPLC-Flu y GC-MS/MS, empleado las técnicas de MAE, MSPD y PLE para la extracción de los analitos de la matriz.

La extracción selectiva de compuestos específicos de muestras de lodo es una tarea muy complicada, porque los lodos contienen una gran variedad de componentes y contaminantes, que difieren en polaridad y naturaleza química, además de grandes cantidades de carbón. Por otro lado, la naturaleza hidrofóbica de los PAHs, conduce a una fuerte adsorción en la materia orgánica y los ácidos húmicos de los suelos, lo que dificulta su extracción. Generalmente, se requieren métodos de extracción y limpieza muy eficientes, para llevar a cabo la correcta determinación analítica.

En este trabajo, se han desarrollado metodologías rápidas y sencillas para el análisis de PAHs en muestras de lodo y suelo, mediante las cuales se consiguen extracciones cuantitativas de los contaminantes estudiados, así como bajos límites de cuantificación, que permiten su determinación a los niveles establecidos en la legislación existente.

A continuación, se exponen, de un modo más concreto, algunas conclusiones y consideraciones adicionales relacionadas con cada uno de los trabajos de investigación desarrollados en este **Capítulo 1.2**.

PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO Y SUELO MEDIANTE EXTRACCIÓN Y SAPONIFICACIÓN ASISTIDAS POR MICROONDAS

Por primera vez, se ha utilizado la energía de microondas para llevar a cabo simultáneamente, la extracción de los PAHs y la hidrólisis del material lipídico de muestras de lodos y suelos.

A pesar de que ciertas condiciones de extracción, como tiempo, temperatura y volumen de disolvente, fueron adoptadas del trabajo previamente desarrollado para pescados; la diferente naturaleza de la matriz, hizo necesario la

1. MUESTRAS SÓLIDAS

optimización de parámetros, como el disolvente de extracción y el protocolo de limpieza de los extractos. Además, se evaluó la influencia del tratamiento alcalino en la limpieza de los extractos y en la recuperación de los analitos.

Utilizando n-hexano como disolvente de extracción y una disolución saturada de hidróxido potásico en metanol para la saponificación de las muestras, se consigue la extracción cuantitativa de todos los compuestos estudiados.

El tratamiento alcalino ejerce una clara influencia positiva en la recuperación de los analitos y en la limpieza de los extractos. La inclusión de una etapa de digestión alcalina durante la extracción, produce la ionización de compuestos ácidos, tales como derivados fenólicos y sustancias húmicas, dificultando su transferencia al disolvente de extracción no-polar y liberando los analitos asociados a estos componentes de la matriz. Así, las recuperaciones obtenidas para la mayoría de los analitos en ausencia de hidrólisis alcalina fueron entre 40-60% menores.

La purificación de los extractos resultó más efectiva cuando se utiliza un cartuchos de sílice y Florisil conectados en serie, acondicionados con 4 mL de diclorometano y 4 mL de hexano-diclorometano (1:1, v/v) y elución con 8 mL de la misma mezcla.

El método desarrollado para muestras de lodos, se aplicó a suelos agrícolas e industriales, obteniendo excelentes resultados en ambos casos, lo que demuestra la gran aplicabilidad de la metodología optimizada.

Finalmente, el método se validó utilizando materiales de referencia certificados (BCR088 (lodo) y CRM 524 (suelo industrial)).

OPTIMIZACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRA BASADO EN LA DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN SUELO

El método desarrollado constituye la primera aplicación de MSPD para la determinación de PAHs en suelos.

La optimización de las variables de extracción resultó ser un parámetro clave a la hora de obtener recuperaciones cuantitativas de los analitos. El

tratamiento alcalino de la muestra en la etapa de dispersión, y la elección del disolvente de elución adecuado, fueron factores de gran importancia para conseguir resultados satisfactorios.

El tratamiento alcalino favorece la extracción de contaminantes orgánicos que están asociados u ocluidos en la materia orgánica del suelo, y que son de difícil acceso para los disolventes. La hidrólisis de la materia orgánica rompe enlaces ésteres y origina la descomposición de la cadena húmica macromolecular, favoreciendo la llegada del disolvente a los contaminantes orgánicos. Los compuestos orgánicos que están asociados a la materia orgánica mediante enlaces hidrolizables, serán liberados en estas condiciones.

Por otro lado, las condiciones alcalinas originan una extensión de la estructura molecular polimérica, como resultado de repulsiones mutuas entre grupos cargados negativamente (carboxilos, fenólicos e hidroxilos). Esto también mejora la accesibilidad del disolvente dentro de la estructura macromolecular, favoreciendo la extracción de los contaminantes.

Como resultado, los PAHs adsorbidos, se vuelven más accesibles al disolvente y se consigue una extracción más eficiente. Así, 2 mL de acetona o 6 mL de una mezcla hexano-acetona (1:1, v/v), son suficientes para la extracción cuantitativa de todos los PAHs estudiados.

Respecto a la limpieza de los extractos, la combinación de sílice y Florisil en la co-columna fue la opción más efectiva a la hora de eliminar los compuestos interferentes, produciendo mejores resultados en términos de recuperación y limpieza de los extractos. Así, se consigue la extracción y limpieza en una sola etapa, reduciendo el tiempo de análisis, el consumo de disolventes y la manipulación de la muestra.

En definitiva, la optimización de los parámetros de extracción ha permitido obtener excelentes recuperaciones (**94.3-102.6%**) para todos los PAHs estudiados.

El método se ha validado utilizando un material de referencia certificado, obteniendo buena concordancia entre los valores encontrados y los valores certificados en el material; y además se ha establecido una comparación entre los

1. MUESTRAS SÓLIDAS

métodos de MSPD y MAE, obteniendo resultados comparables mediante las dos metodologías.

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE DISPERSIÓN DE LA MATRIZ EN FASE SÓLIDA PARA LA DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS DE LODOS

En este trabajo se ha optimizado un método de preparación de muestras de lodo utilizando MSPD. Mediante esta técnica se lleva a cabo la extracción y limpieza en una única etapa, y se obtienen extractos que pueden inyectarse directamente en el cromatografo, después de realizar un cambio de disolvente.

El principal problema a resolver radica en conseguir la extracción eficiente de analitos como los PAHs, que se adsorben fuertemente a las partículas de lodos, utilizando una técnica poco enérgica, como MSPD. Sin embargo, la cuidadosa optimización de los parámetros de extracción (aditivo, agente dispersante, adsorbente en co-columna, disolvente de elución, etc), permite desarrollar una metodología analítica de gran calidad. El disolvente de elución y la cantidad de aditivo, resultaron parámetros clave para conseguir la recuperación cuantitativa de los analitos. Utilizando 1 mL de potasa en la etapa de dispersión y una mezcla de diclorometano-metanol (90:10, v/v) como disolvente, se consiguen recuperaciones excelentes de los PAHs estudiados.

La validación de la metodología optimizada se lleva a cabo utilizando un material de referencia (RTC-CNS312-04) y un material de referencia certificado (BCR088). Además las recuperaciones obtenidas mediante el método propuesto se comparan con las obtenidas mediante el método de MAE desarrollado previamente, observando buena concordancia entre las dos técnicas.

Finalmente, se analizaron muestras reales utilizando la metodología optimizada. Los PAHs fueron detectados en todas las muestras de lodo analizadas con concentraciones que varían entre 1.1 y 10.3 mg Kg⁻¹ (suma de los 17 PAHs estudiados).

En definitiva, este método constituye un gran avance en simplicidad y eficiencia, que puede ser utilizado para monitorización de rutina.

DESARROLLO DE UN PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE LODO MEDIANTE EXTRACCIÓN SELECTIVA CON LÍQUIDOS PRESURIZADOS

Uno de los principales problemas que surgen a la hora de desarrollar un método de PLE, es que generalmente se obtienen extractos sucios, que presentan grandes cantidades de sustancias co-extraídas. Por lo tanto, para llevar a cabo la correcta determinación de los analitos, es necesario someter al extracto a etapas de limpieza adicionales, que incrementan el tiempo de análisis y el consumo de disolventes.

En este trabajo, se lleva a cabo la extracción y limpieza de manera simultánea, utilizando PLE con limpieza en celda. Incluyendo la cantidad necesaria de sólidos adsorbentes en el interior de la celda, se obtienen extractos limpios, que pueden inyectarse directamente en el sistema cromatográfico, facilitando la determinación de los analitos.

El tratamiento de la muestra resultó ser un parámetro de gran importancia a la hora de obtener resultados satisfactorios. Se observó una importante mejora en las recuperaciones cuando la muestra se somete a una etapa previa de dispersión.

Al igual que en los métodos optimizados anteriormente, se observa que el tratamiento alcalino de la muestra, durante la etapa de dispersión, ejerce un efecto claramente positivo, en la limpieza de los extractos, y en la recuperación de los analitos. La cantidad de sulfato sódico anhidro también es un parámetro importante, que está relacionado con la cantidad de potasa utilizada en la dispersión. 0.5 g de sulfato sódico anhidro fueron suficientes para producir buenas recuperaciones si se utiliza 1 mL de potasa como aditivo, mientras que si se incrementa el aditivo a 1.5 mL, se necesitan 1.5 g de sulfato.

Una vez que optimizada la etapa de preparación de la muestra, se prueban diferentes disolventes de extracción. Utilizando n-hexano, se obtienen recuperaciones cuantitativas de los PAHs estudiados y al mismo tiempo se consigue la extracción selectiva de los analitos de interés.

Finalmente, se optimizaron los parámetros de extracción de PLE, tales como presión, temperatura, número de ciclos, volumen de disolvente, etc. Los parámetros más influyentes fueron la temperatura y el volumen de disolvente,

1. MUESTRAS SÓLIDAS

mientras que factores como presión, número de ciclos y tiempo de extracción no ejercen demasiada influencia en la extracción de los analitos. Así, llevando a cabo la extracción a 1500 psi y 140 °C, durante 1 ciclo de 5 min, se consiguen resultados satisfactorios para todos los PAHs estudiados, evitando el uso de disolventes clorados altamente tóxicos.

Por otro lado, se ha optimizado un nuevo método cromatográfico de GC-MS/MS utilizando el vaporizador de temperatura programada para la inyección de grandes volúmenes. La posibilidad de introducir grandes volúmenes de extracto en el cromatógrafo de gases, implica ciertas ventajas, como por ejemplo mejora en la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación, respecto a aquellos obtenidos mediante la inyección convencional en split/splitless.

A pesar de que HPLC-Flu resulta más sensible que GC-MS/MS, los bajos límites de cuantificación obtenidos en ambos casos ($0.0001\text{--}0.005\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ y $0.01\text{--}0.2\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente) permiten la determinación de los PAHs por debajo de los límites legales existentes. Además, GC-MS/MS presenta una ventaja importante frente a HPLC-Flu, ya que los extractos resultantes de PLE pueden inyectarse directamente en GC-MS/MS, mientras que HPLC requiere una etapa de evaporación para llevar a cabo un cambio de disolvente, que sea compatible con las fases móviles utilizadas.

El método PTV-LVI-GC-MS/MS desarrollado, se utilizó con fines de confirmación y validación de los resultados obtenidos previamente mediante HPLC-Flu, obteniendo resultados concordantes mediante las dos técnicas de determinación utilizadas.

La metodología analítica desarrollada se aplicó al análisis de un material de referencia (RTC-CNS312-04) y un material de referencia certificado (BCR088). Los resultados obtenidos con el método propuesto, bien sea utilizando HPLC-Flu o PTV-LVI-GC-MS/MS, concuerdan con los valores de referencia y certificados de los materiales analizados.

Por otro lado, el método se aplicó al análisis de muestras reales, y los PAHs se encontraron en todas las muestras analizadas, en concentración entre 1.1 y $479.6\text{ }\mu\text{g g}^{-1}$ (suma de los PAHs estudiados en este trabajo). Dos de las muestras analizadas, procedentes de áreas industrializadas, presentan concentraciones muy superiores al límite legal establecido por la UE. Este hecho confirma la necesidad de

extremar las precauciones, y realizar controles de lodos que van a ser utilizados en prácticas agrícolas.

COMPARACIÓN DE LAS METODOLOGÍAS DESARROLLADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS DE LODO DE DEPURADORA.

A continuación, se recogen algunos de los parámetros de las técnicas de extracción desarrolladas para la determinación de PAHs en lodos.

Tabla IV.1 Datos comparativos de los métodos desarrollados para la determinación de PAHs en muestras de lodo

Parámetros	MAE	MSPD	PLE
Cantidad de muestra (g)	0.2	0.2	0.2
Disolvente de extracción	hexano	DCM-MeOH (9:1)	hexano
Consumo de disolvente (mL) ^a	10	6	21
Tiempo de extracción (min.)	23	10	20
Etapas de limpieza adicional	SPE	No requiere ^b	No requiere ^b
Técnica de determinación	HPLC-Flu	HPLC-Flu	HPLC-Flu
Recuperación (%) ^c	91-101	76-104	85-107
R.S.D. (%)	<6	<6	<11
LOQs ($\mu\text{g g}^{-1}$) ^d	0.0002-0.01	0.0001-0.005	0.0001-0.005
Coste	medio	bajo	medio

^a Consumo de disolvente asociado a la etapa de extracción; no se incluye el disolvente utilizado en la etapa de limpieza. ^b La extracción y la limpieza se llevan a cabo simultáneamente. ^c Recuperaciones corregidas teniendo las pérdidas de evaporación asociadas a cada proceso. ^d Límites de cuantificación del método analítico.

El estudio de los parámetros analíticos de las metodologías desarrolladas, tales como linealidad, precisión, recuperaciones y límites de detección y cuantificación, demuestran que los tres métodos propuestos son adecuados para la determinación de los PAHs en matrices medioambientales de gran complejidad, como los lodos de depuradora.

Las técnicas desarrolladas proporcionan excelentes recuperaciones de los analitos estudiados. La correcta optimización de los parámetros de extracción permite la extracción cuantitativa de todos los compuestos, incluso mediante una técnica de extracción menos enérgica, como es el caso de MSPD.

1. MUESTRAS SÓLIDAS

Mediante MAE y PLE se consigue la extracción selectiva de los PAHs, utilizando un disolvente poco polar, como n-hexano; mientras que para la extracción cuantitativa de los analitos mediante MSPD es necesario utilizar un disolvente más enérgico (tabla IV.1). Por otro lado, la elución de los analitos del cartucho de MSPD se consigue utilizando un pequeño volumen de disolvente, mientras que MAE y PLE necesitan volúmenes algo mayores para la extracción cuantitativa.

Una ventaja asociada a las metodologías analíticas desarrolladas, es que las tres, producen resultados altamente reproducibles, utilizando pequeñas cantidades de muestra. Este es un aspecto importante cuando se trata de aplicar los métodos analíticos a análisis de rutina para el control de matrices medioambientales de este tipo.

Por otro lado, se obtienen bajos límites de cuantificación para los tres métodos desarrollados, utilizando HPLC-Flu. En el caso de PLE, se utiliza una técnica cromatográfica alternativa, con fines de confirmación y validación de los resultados. Aunque los límites de cuantificación alcanzados mediante PTV-LVI-GC-MS/MS no son tan bajos como los obtenidos mediante HPLC-Flu, hay que destacar que son del orden de los que se encuentran en la bibliografía para la determinación de PAHs en este tipo de muestras.

Los métodos desarrollados se han aplicado al análisis de materiales de referencia certificados y muestras reales. En las tablas IV.2 y IV.3, se recogen a modo de ejemplo, las concentraciones de PAHs en algunas de las muestras de lodo analizadas, mediante las tres metodologías propuestas.

Tabla IV.2 Concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1} \pm 2 \text{ SD}$) encontradas en el material de referencia certificado BCR088 y en el material de referencia RTCNS312-04 mediante las tres metodologías desarrolladas.

PAHs	BCR088				RTCNS312-04			
	MAE (n=5)	MSPD (n=6)	PLE (n=7)	Certificadas	MAE (n=5)	MSPD (n=6)	PLE (n=7)	Certificadas
Naft	0.40 \pm 0.01	0.468 \pm 0.002	0.44 \pm 0.05		2.26 \pm 0.09	2.76 \pm 0.05	3.1 \pm 0.4	2.58 \pm 0.53
Ace	0.23 \pm 0.01	n.e	0.151 \pm 0.005		2.7 \pm 0.3	3.06 \pm 0.02	3.4 \pm 0.4	2.99 \pm 0.46
Flu	0.36 \pm 0.01	0.40 \pm 0.04	0.39 \pm 0.06		1.7 \pm 0.1	2.13 \pm 0.01	2.31 \pm 0.06	2.01 \pm 0.32
Fen	3.45 \pm 0.01	2.91 \pm 0.05	2.9 \pm 0.2		0.56 \pm 0.01	0.55 \pm 0.01	0.56 \pm 0.07	0.46 \pm 0.11
Ant	0.353 \pm 0.002	0.339 \pm 0.002	0.35 \pm 0.03		1.63 \pm 0.06	1.67 \pm 0.02	1.89 \pm 0.09	1.67 \pm 0.27
Fluor	4.70 \pm 0.03	4.38 \pm 0.04	4.0 \pm 0.4		4.5 \pm 0.3	4.5 \pm 0.1	4.7 \pm 0.2	4.19 \pm 0.57
Pir	2.208 \pm 0.003	2.08 \pm 0.04	2.09 \pm 0.14	2.16 \pm 0.09	4.7 \pm 0.1	4.39 \pm 0.04	4.4 \pm 0.7	4.17 \pm 0.51
B[a]A	0.991 \pm 0.004	1.012 \pm 0.006	0.86 \pm 0.06	0.93 \pm 0.09	1.56 \pm 0.06	1.54 \pm 0.02	1.5 \pm 0.2	1.45 \pm 0.18
Cris	1.358 \pm 0.002	1.310 \pm 0.006	1.3 \pm 0.1		1.1 \pm 0.1	1.11 \pm 0.01	1.2 \pm 0.1	1.12 \pm 0.15
B[<i>e</i>]P	1.17 \pm 0.04	1.032 \pm 0.005	1.11 \pm 0.09	1.02 \pm 0.07	0.42 \pm 0.01	0.426 \pm 0.004	0.49 \pm 0.04	
B[b]F	1.206 \pm 0.003	1.183 \pm 0.001	1.1 \pm 0.1	1.17 \pm 0.08	0.28 \pm 0.02	0.252 \pm 0.005	0.28 \pm 0.03	0.24 \pm 0.05
B[k]F	0.513 \pm 0.005	0.574 \pm 0.003	0.53 \pm 0.04	0.57 \pm 0.05	0.67 \pm 0.09	0.67 \pm 0.02	0.68 \pm 0.07	0.68 \pm 0.09
B[a]P	0.89 \pm 0.01	0.96 \pm 0.01	0.86 \pm 0.07	0.91 \pm 0.09	0.95 \pm 0.06	0.88 \pm 0.02	0.90 \pm 0.09	0.87 \pm 0.12
DB[a,l]P	n.e	0.046 \pm 0.001	0.059 \pm 0.005		0.015 \pm 0.001	0.013 \pm 0.002	0.024 \pm 0.001	
DB[a,h]A	0.406 \pm 0.002	0.134 \pm 0.008	0.145 \pm 0.008		0.43 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02	0.44 \pm 0.02	0.41 \pm 0.07
B[g,h,i]P	0.67 \pm 0.02	0.707 \pm 0.002	0.68 \pm 0.03		0.87 \pm 0.06	0.84 \pm 0.01	0.79 \pm 0.09	0.84 \pm 0.17
I[1,2,3-c,d]P	0.81 \pm 0.02	0.81 \pm 0.02	0.81 \pm 0.05		0.54 \pm 0.05	0.55 \pm 0.01	0.55 \pm 0.04	0.54 \pm 0.12
Residuo ^a	12.0 \pm 0.9	20.1 \pm 0.5	24.6 \pm 1.2		13.9 \pm 2.0	27.8 \pm 1.4	24.5 \pm 2.1	
Residuo sin SPE ^a	23.3 \pm 0.4							
C (%)	27.1				30.4			
Lípidos (%)	9.0				6.1			

Concentraciones referidas a peso seco; ^a residuo ($\text{mg g}^{-1} \pm \text{S.D.}$); residuo sin SPE, se refiere al residuo seco obtenido con MAE sin etapa de limpieza mediante SPE; n.e., no evaluado; C (%), porcentaje de carbono total que contiene la muestra; lípidos (%), porcentaje de lípidos que contiene la muestra.

1. MUESTRAS SÓLIDAS

En las tablas IV.2 y IV.3 se observa que los resultados obtenidos mediante las diferentes metodologías estudiadas son comparables entre sí, no observándose variaciones importantes en las concentraciones de PAHs. La diferencia más notable se encuentra en los valores del residuo seco, obtenidos tras llevar a sequedad mediante corriente de nitrógeno, un determinado volumen de extracto. En todos los casos, los valores más bajos se obtienen mediante MAE, observándose una mayor diferencia en aquellas muestras que presentan un elevado contenido lipídico. Esta tendencia resulta razonable, ya que mediante esta metodología, la saponificación de los lípidos se lleva a cabo con un volumen elevado (4 mL) de una disolución de hidróxido potásico en metanol, y está favorecida por el calentamiento mediante energía de microondas. Además, este protocolo incluye una etapa de centrifugación seguido de una etapa de limpieza adicional mediante SPE, con cartuchos de sílice y Florisil conectados en serie. En el caso de MSPD y PLE, se utiliza un menor volumen de disolución alcalina para la saponificación, y además en el caso de MSPD se lleva a cabo a temperatura ambiente, por lo que probablemente el proceso no sea tan exhaustivo.

Tabla IV.3 Concentraciones ($\mu\text{g g}^{-1} \pm 2 \text{ SD}$) de PAHs encontradas en muestras reales mediante los tres métodos propuestos.

PAHs	Pool lodos con adición			Muestra 1		
	MAE (n=3)	MSPD (n=6)	PLE (n=7)	MAE (n=3)	MSPD (n=3)	PLE (n=3)
Naft	0.47 \pm 0.02	0.432 \pm 0.006	0.50 \pm 0.07	4.3 \pm 0.2	4.2 \pm 0.6	4.2 \pm 0.2
Ace	0.56 \pm 0.02	0.591 \pm 0.004	0.68 \pm 0.08	0.44 \pm 0.04	0.396 \pm 0.07	0.46 \pm 0.05
Flu	0.37 \pm 0.02	0.446 \pm 0.001	0.47 \pm 0.03	0.45 \pm 0.03	0.45 \pm 0.02	0.438 \pm 0.008
Fen	3.338 \pm 0.008	3.211 \pm 0.006	3.4 \pm 0.1	1.86 \pm 0.004	1.876 \pm 0.017	1.8 \pm 0.2
Ant	0.276 \pm 0.002	0.263 \pm 0.002	0.25 \pm 0.05	0.10 \pm 0.01	0.093 \pm 0.004	0.088 \pm 0.007
Fluor	1.335 \pm 0.006	1.297 \pm 0.004	1.2 \pm 0.1	0.78 \pm 0.02	0.75 \pm 0.04	0.70 \pm 0.03
Pir	1.099 \pm 0.005	1.095 \pm 0.002	1.09 \pm 0.05	0.44 \pm 0.02	0.44 \pm 0.02	0.386 \pm 0.005
B[a]P	0.324 \pm 0.004	0.311 \pm 0.002	0.32 \pm 0.02	0.036 \pm 0.001	0.038 \pm 0.003	0.037 \pm 0.002
Cris	2.147 \pm 0.003	2.154 \pm 0.007	2.17 \pm 0.09	n.d.	n.d.	n.d.
B[e]P	0.842 \pm 0.01	0.84 \pm 0.01	0.83 \pm 0.08	n.d.	n.d.	n.d.
B[b]F	0.508 \pm 0.009	0.506 \pm 0.003	0.51 \pm 0.08	0.060 \pm 0.003	0.057 \pm 0.002	0.056 \pm 0.004
B[k]F	0.35 \pm 0.05	0.330 \pm 0.001	0.34 \pm 0.03	0.028 \pm 0.001	0.026 \pm 0.001	0.026 \pm 0.004
B[a]P	0.357 \pm 0.03	0.350 \pm 0.001	0.33 \pm 0.02	0.03 \pm 0.01	0.027 \pm 0.005	0.028 \pm 0.005
DB[a,l]P	0.044 \pm 0.001	0.045 \pm 0.001	0.04 \pm 0.01	n.d.	n.d.	n.d.
DB[a,h]P	0.40 \pm 0.07	0.384 \pm 0.002	0.36 \pm 0.05	n.d.	n.d.	n.d.
B[g,h,i]P	0.25 \pm 0.05	0.221 \pm 0.001	0.23 \pm 0.02	0.042 \pm 0.001	0.041 \pm 0.003	0.042 \pm 0.004
I[1,2,3-c,d]P	0.150 \pm 0.005	0.114 \pm 0.004	0.15 \pm 0.02	0.036 \pm 0.001	0.033 \pm 0.001	0.030 \pm 0.003
Residuo ^a	7.2 \pm 0.5	21.6 \pm 1.6	21.8 \pm 0.9	10.2 \pm 1.4	104.2 \pm 2.6	20.4 \pm 2.1
Residuo sin SPE ^a	29.1 \pm 1.6			48.0 \pm 6.8		
C (%)	32.6			42.3		
Lípidos (%)	6.2			20.8		

Concentraciones referidas a peso seco; pool de lodos con adición, mezcla de lodos con adición entre 0.1 -1 $\mu\text{g g}^{-1}$; ^a residuo (mg g^{-1}) \pm SD; residuo sin SPE, se refiere al residuo seco obtenido con MAE sin etapa de limpieza mediante SPE; n.d., no detectado; C (%), porcentaje de carbono que contiene la muestra; lípidos (%), porcentaje de lípidos que contiene la muestra.

Sin embargo, a pesar de que los residuos obtenidos con MSPD y PLE son ligeramente más elevados que los correspondientes a MAE, la limpieza de los extractos se realiza de manera simultánea a la extracción de los analitos, mediante el uso de co-columna y limpieza en celda, respectivamente. De este modo, se consiguen importantes ventajas en términos de tiempo de preparación de muestra, y en el caso de la MSPD también de un ahorro considerable de disolvente. Es importante destacar que no se apreciaron diferencias importantes en los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC con detector de fluorescencia para los diferentes extractos. En las figuras IV.1 y IV.2 se representan a modo de ejemplo los cromatogramas de los extractos del material de referencia BCR088 y de la muestra 1.

En definitiva, se proponen tres procedimientos de preparación de muestra, que serán elegidos en función de las necesidades de cada laboratorio y de los medios que este disponga. MAE y PLE requieren una inversión inicial debido al elevado coste de los equipos de extracción, mientras que MSPD sólo requiere de una mano y mortero de vidrio, por lo que el coste es muy bajo. Sin embargo, si lo que se persigue es la automatización, para llevar a cabo el análisis de un número elevado de muestras, la mejor opción es PLE, ya que permite realizar hasta 24 extracciones de manera desatendida.

1. MUESTRAS SÓLIDAS

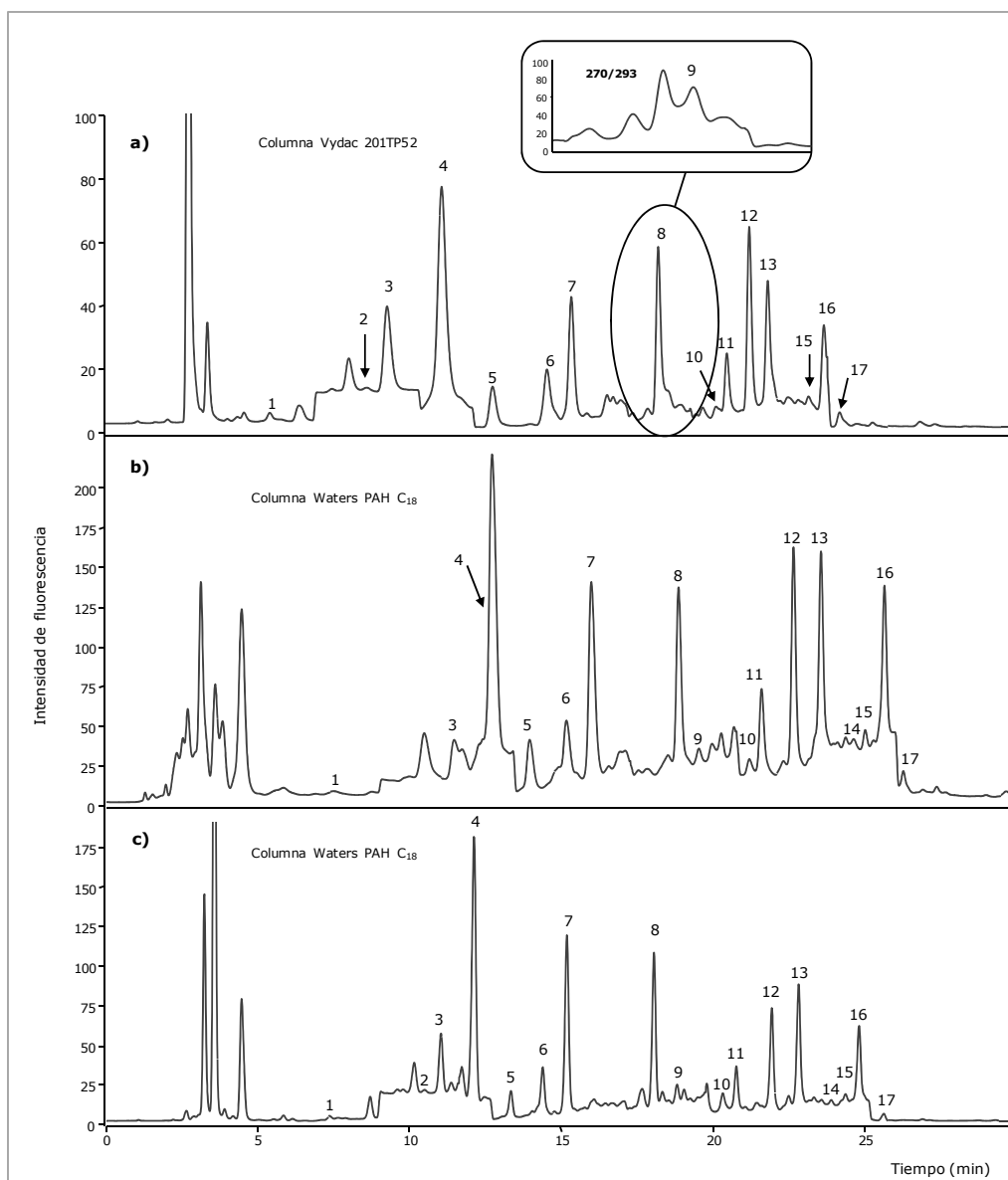


Figura IV.1 Cromatogramas de los extractos de lodo BCR088 obtenidos mediante a) MAE-HPLC-Flu, b) MSPD-HPLC-Flu, c) PLE-HPLC-Flu. Asignación de los picos: 1, naft; 2, ace; 3, flu; 4, fen; 5, ant; 6, fluor; 7, pir; 8, B[a]A; 9, cris; 10, B[e]P; 11, B[b]F; 12, B[k]F; 13, B[a]P; 14, DB[a,i]P; 15, DB[a,h]P, 16, B[g,h,i]P, 17, I[1,2,3-c,d]P.

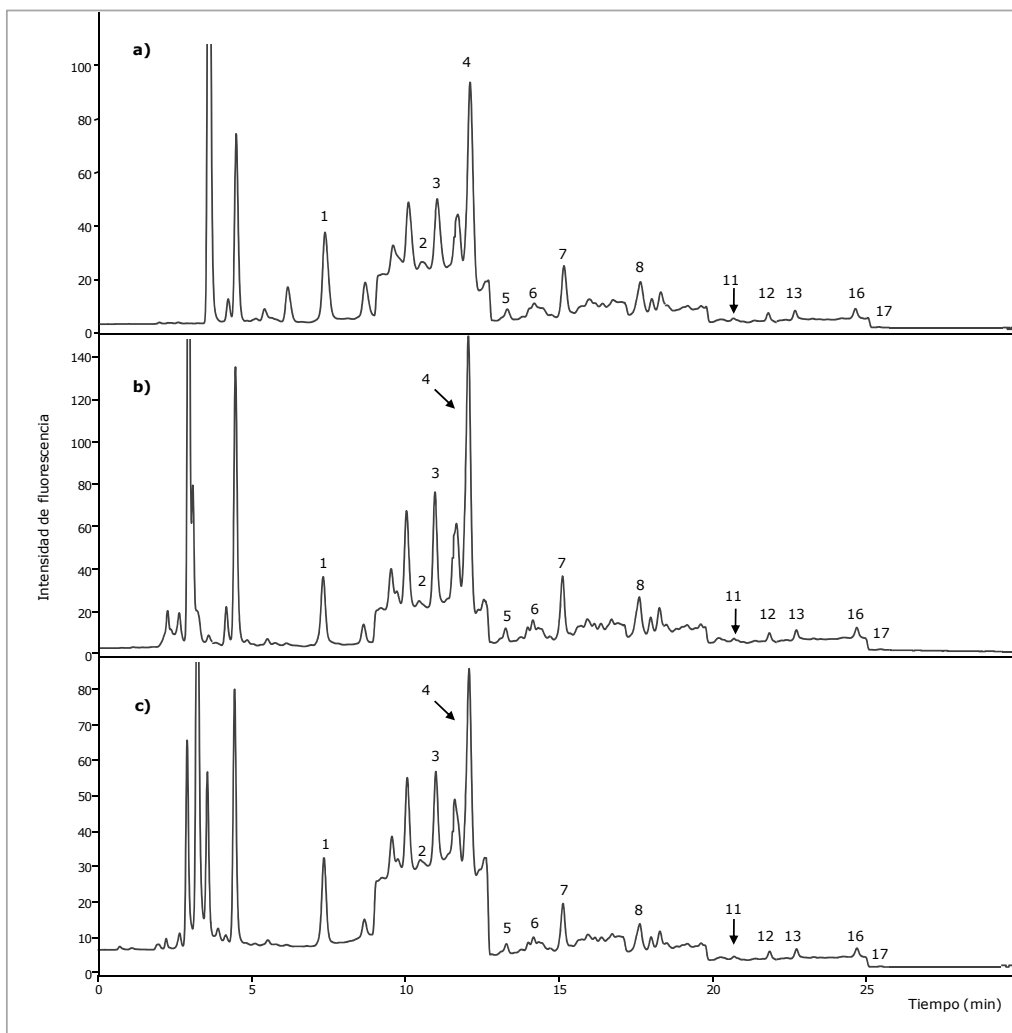


Figura IV.2 Cromatogramas de los extractos de la muestra 1 obtenidos mediante a) MAE-HPLC-Flu, b) MSPD-HPLC-Flu, c) PLE-HPLC-Flu. Asignación de los picos: 1, naft; 2, ace; 3, flu; 4, fen; 5, ant; 6, fluor; 7, pir; 8, B[a]A; 9, cris; 10, B[e]P; 11, B[b]F; 12, B[k]F; 13, B[a]P; 14, DB[a,i]P; 15, DB[a,h]P, 16, B[g,h,i]P, 17, I[1,2,3-c,d]P.

2. DETERMINACIÓN DE PAHs EN MUESTRAS ACUOSAS

La contaminación del agua constituye uno de los principales problemas ambientales. Cantidades ingentes de sustancias originadas en la actividad humana son vertidas al mar, a los ríos, arroyos y lagos. Pesticidas, desechos químicos, metales pesados, residuos radiactivos, hidrocarburos, plaguicidas y plásticos, son algunas de las sustancias que se encuentran, en cantidades mayores o menores, al analizar las aguas de los más remotos lugares del mundo.

Los PAHs están considerados como serios contaminantes del agua. A pesar de su marcado carácter hidrofóbico, estos contaminantes están presentes en el medio acuático, como consecuencia de su fuerte adsorción a materia particulada y sedimentos. Además, la gran cantidad de fuentes que emiten PAHs al medio ambiente, contribuye a que la contaminación en los sistemas de almacenamiento, en las fuentes de abastecimiento subterráneas y superficiales, así como en otros cuerpos de agua, sea un hecho que ocurra con relativa frecuencia.

En base a la gran distribución y a los efectos nocivos que ejercen estos contaminantes, y teniendo en cuenta que el agua es uno de los recursos naturales fundamentales, resulta de gran importancia llevar a cabo controles preventivos que permitan evaluar la calidad de la misma.

La determinación de PAHs en aguas no es una tarea sencilla. La mayoría de los problemas asociados con la determinación de estos contaminantes en muestras acuosas, están derivados de las bajas concentraciones en las que se encuentran, como consecuencia de su baja solubilidad en agua. Otros factores que dificultan su determinación son las pérdidas durante las etapas de muestreo y almacenamiento, debido fundamentalmente a la tendencia de los PAHs a adsorberse a las paredes de los recipientes que contienen las muestras. Por otro lado, la cuantificación de rutina de PAHs en aguas a los bajos niveles establecidos por la **EPA** y la **EU**, requiere el desarrollo de métodos analíticos que proporcionen extracciones muy eficientes, y que permitan su determinación de manera simple, rápida y con bajo coste.

Como se ha mencionado previamente (**Capítulo II.2.1**), las técnicas más comunes de extracción de PAHs en muestras de agua son LLE y SPE. Sin embargo, estas técnicas son tediosas y presentan numerosas desventajas, tales como un elevado consumo de disolvente y formación de emulsiones estables en LLE,

2. MUESTRAS ACUOSAS

adsorciones muy fuertes y en algunos casos irreversibles en SPE, y posibles pérdidas de moléculas volátiles durante la etapa de concentración de disolvente en ambas técnicas. Otra desventaja, es que generalmente requieren grandes volúmenes de muestra.

Las tendencias actuales en Química Analítica, están dirigidas hacia la simplificación de la preparación de muestra. Así, el desarrollo de metodologías precisas y sensibles, a la par que rápidas y simples, se ha convertido en un importante objetivo.

2.1. DETERMINACIÓN DE PAHs EN AGUA

2.1.1. INTRODUCCIÓN

El objetivo de este apartado es describir el desarrollo de un método de determinación de PAHs en agua, utilizando **DLLME** como técnica de extracción y concentración y **HPLC con detección de fluorescencia** como técnica de análisis. Una de las ventajas más sobresalientes que caracteriza a la DLLME y principal causa de su elección, es que aúna en una sola etapa extracción y concentración de los analitos, hecho que simplificaría sobremanera los análisis a realizar. A priori, se le suponían algunas ventajas que mejorarían las conocidas limitaciones de técnicas más convencionales; entre ellas, su sencillez y la escasa cantidad de disolvente requerido.

En el momento de desarrollar este trabajo, se presentaba un inconveniente adicional, ya que la mayoría de las aplicaciones de DLLME utilizan un disolvente orgánico clorado, que en nuestro caso, resulta incompatible con el sistema de determinación. Para solventar este problema, se plantea la posibilidad de utilizar un **líquido iónico** como disolvente de extracción. Las propiedades físicoquímicas de los ILs dependen de la naturaleza y tamaño del catión y del anión que los forman. Por tanto, podemos ajustarlas variando la estructura y combinaciones de cationes y aniones, siendo esta versatilidad una de las principales características de estos materiales.

En base a los fundamentos de la técnica de extracción utilizada, el disolvente de extracción debe ser inmiscible en agua, y a su vez debe presentar capacidad de extracción para los analitos. Así, los ILs estudiados en este trabajo, pertenecen a la familia **hexafluorofosfato de 1-alkil-3-metilimidazolio**. Se trata de ILs inmiscibles en agua, que presentan cadenas alquílicas de diferente longitud en el catión imidazolio. Estas cadenas le confieren carácter apolar y disminuyen la solubilidad en agua, favoreciendo el paso de los PAHs de la muestra de agua hacia el disolvente de extracción.

Como se ha mencionado anteriormente, la baja polaridad de los PAHs determina una de las principales dificultades a la hora de su análisis en muestras de agua. Su carácter hidrófobo es tal, que los PAHs tienden a adsorberse en cualquier material sólido (paredes de vidrio de recipientes, conductos por los que pasa la

2. MUESTRAS ACUOSAS

muestra, etc.) causando importantes pérdidas durante el muestreo, almacenamiento y en algunos casos durante el análisis. La adición de un disolvente orgánico miscible con el agua en el momento del muestreo, evita las pérdidas por adsorción del recipiente en el que la muestra será almacenada. Sin embargo, este es un factor a tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de análisis, ya que la presencia de un disolvente orgánico en la muestra, puede influir en el sistema de extracción.

En consecuencia, se ha evaluado la influencia de la adición de un disolvente orgánico en la etapa de muestreo, en la eficiencia del proceso de extracción de los analitos. Así, se ha optimizado el tipo de disolvente y el porcentaje del mismo.

Por otro lado, se han estudiado los diferentes factores influyentes en el proceso de DLLME, evaluando la recuperación de los analitos y los factores de enriquecimiento. Así, se han optimizado parámetros como tiempo de extracción, tiempo de centrifugación, tipo y volumen del disolvente de extracción, tipo y volumen del disolvente dispersante, etc.

Una vez optimizado el método de extracción, se han estudiado los parámetros analíticos del método propuesto, y finalmente, éste se aplica al análisis de diferentes muestras de agua (grifo, botella, fuente, pozo, río, agua de lluvia y agua residual).

Los resultados obtenidos se resumen en la publicación que se incluye a continuación.

2.1.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN MUESTRAS DE AGUA

Publicación VI. "Development of an ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples", *J. Chromatogr. A* 1216 (2009) 6356 (pág. 321).

**2.1.2. DESARROLLO DE UN MÉTODO DE MICROEXTRACCIÓN
LÍQUIDO-LÍQUIDO DISPERSIVA PARA EL ANÁLISIS DE PAHs EN
MUESTRAS DE AGUA**

Publicación VI

**DEVELOPMENT OF AN IONIC LIQUID BASED DISPERSIVE LIQUID-
LIQUID MICROEXTRACTION METHOD FOR THE ANALYSIS OF
POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER SAMPLES**

J. Chromatogr. A 1216 (2009) 6356

Doi:10.1016/j.chroma.2009.07.032

DEVELOPMENT OF AN IONIC LIQUID BASED DISPERSIVE LIQUID-LIQUID MICROEXTRACTION METHOD FOR THE ANALYSIS OF POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN WATER SAMPLES

M^a Teresa Pena, M^a Carmen Casais, M^a Carmen Mejuto, Rafael Cela

Dpto. Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Instituto de Investigación y Análisis Alimentario, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

Abstract

A simple, rapid and efficient method, ionic liquid based dispersive liquid-liquid microextraction (IL-DLLME), has been developed for the first time for the determination of 18 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water samples. The chemical affinity between the ionic liquid (1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate) and the analytes permits the extraction of the PAHs from the sample matrix also allowing their preconcentration. Thus, this technique combines extraction and concentration of the analytes into one step and avoids using toxic chlorinated solvents. The factors affecting the extraction efficiency, such as the type and volume of ionic liquid, type and volume of disperser solvent, extraction time, dispersion stage, centrifuging time and ionic strength, were optimised. Analysis of extracts was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with fluorescence detection (Flu). The optimised method exhibited a good precision level with relative standard deviations values between 1.2% and 5.7%. Quantification limits obtained for all of these considered compounds (between 0.1 and 7 ng L⁻¹) were well below of the limits recommended in the EU. The extraction yields for the different compounds obtained by IL-DLLME, ranged from 90.3% to 103.8%. Furthermore, high enrichment factors (301-346) were also achieved. The extraction efficiency of the optimised method is compared with that achieved by liquid-liquid extraction. Finally, the proposed method was successfully applied to the analysis of PAHs in real water samples (tap, bottled, fountain, well, river, rainwater, treated and raw wastewater).

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons; Ionic liquid; Dispersive liquid-liquid microextraction; Water analysis; Liquid chromatography

1. INTRODUCTION

The toxic nature [1, 2] of some PAHs has warranted their inclusion in environmental control legislation. Many environmental agencies have adopted very low levels of PAHs for potable and natural waters, designed to protect the environment and human health.

On drinking waters, the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) and the World Health Organization (WHO) recommend the routine monitoring of benzo[a]pyrene (B[a]P). According to the EPA, its maximum concentration level should not exceed 200 ng L⁻¹ [3] while the WHO has established the maximum permissible concentration of B[a]P on 700 ng L⁻¹ [4]. In addition to B[a]P, the European Union in Directive 98/83/EC [5] has regulated benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[g,h,i]perylene (B[ghi]P) and indeno[1,2,3-c,d]pyrene (I[1,2,3-c,d]P). Maximum contaminant level values were set at 10 ng L⁻¹ for the highly toxic B[a]P and 100 ng L⁻¹ for the sum of remaining PAH.

The European Union has also fixed very restrictive limits for these compounds in different kinds of superficial waters [6, 7]. The limits for B[a]P were fixed on 50 ng L⁻¹ as annual average value and 100 ng L⁻¹ as maximum admissible concentration for different kinds of superficial waters. The limits for the sum of B[b]F-B[k]F and the sum of B[g,h,i]P-I[1,2,3-c,d]P were fixed on 30 and 2 ng L⁻¹, respectively, as annual average values and as maximum admissible concentration. Naphthalene (Naph, 1200 ng L⁻¹), fluoranthene (Flt, 100 ng L⁻¹) and anthracene (Anth, 100 ng L⁻¹) were also included in this directive.

The routine quantification of PAHs in waters at the low levels fixed by the EPA and EU requires the development of efficient and sensible analytical methods. These compounds are generally extracted from water samples either by liquid-liquid extraction (LLE) [8, 9], and or by solid-phase extraction (SPE) [10]. However, modern trends in analytical chemistry are approached towards the simplification of sample preparation. Thus, in the last years, microextraction techniques are playing an important role in the determination of PAHs. Solid-phase microextraction (SPME) [11], stir bar sorptive extraction (SBSE) [12] and liquid-phase microextraction (LPME) [13, 14] has been developed as alternative techniques to the classical LLE and SPE.

Recently, a simple and rapid preconcentration and microextraction method, named dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME), has been developed [15]. It is based on ternary component solvent system. DLLME employs a mixture of a high-density solvent (extractant) and a water miscible polar solvent (disperser). Acetone, methanol and acetonitrile can be used as dispersers, whereas chlorinated solvents (e.g. chlorobenzene, carbon tetrachloride (CCl_4), tetrachloroethylene (C_2Cl_4)) are usually employed as extractants [16]. The appropriate mixture of extraction solvent is injected into aqueous sample, containing the analytes. The extraction solvent is dispersed into the aqueous sample as very fine droplets and a cloudy solution is formed. Owing to the considerably large surface area between the extraction solvent and the aqueous sample, the equilibrium state is achieved quickly. After centrifugation of cloudy solution, the determination of the analytes in the sedimented phase can be performed by instrumental analysis [15, 17].

DLLME offers several important advantages over conventional solvent extraction methods: faster operation, no need of large amounts of organic extraction solvent, low time and cost and easier linkage to most analytical methods [15]. Thus, since its introduction, DLLME has been frequently used for determination of organic contaminants in liquid samples, including of PAHs [15], organophosphate esters [16], phthalate esters [17] and aromatic amines [18] in water samples.

On the other hand, one of the principal driving forces for the broad investigations in the area of new sample preparation methods is the need to find replacements for environmentally hazardous volatile organic solvents. Thus, ionic liquids (ILs) are receiving much attention owing to their excellent properties and potential application in many fields of analytical chemistry [19].

Ionic liquids possess high thermal stability, negligible vapor pressures, tunable viscosity and miscibility with water and organic solvents, making them attractive alternatives to environmentally unfriendly solvents [20, 21]. As result of these properties, ILs have been considered as green solvents and have been employed in a number of analytical applications [22], including some extraction processes such as liquid-phase microextraction (LPME) [14, 23], solid-phase microextraction (SPME) [24] and single drop microextraction (SDME) [25]. DLLME have been applied to extract different organic compounds such as aromatic amines

[18, 26], heterocyclic insecticides [27] and organophosphorus pesticides [28] in water samples.

The application of the DLLME technique to the determination of PAHs in water samples has been previously reported by Rezaee et al. [15] using a chlorinated solvent (C_2Cl_4) as extractant, followed by one centrifugation step and final determination by gas chromatography coupled with flame ionization detection (GC-FID).

The combination of IL with DLLME provides the additional advantages of producing directly analysable extracts by HPLC while avoiding the use of toxic chlorinated solvents. The aim of the present study was to optimise and validate the IL-DLLME method, for the extraction of 18 PAHs (Naph, acenaphthene (Ace), fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), Anth, Flt, pyrene (Pyr), benz[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chry), 5-methylchrysene (5-MC), benzo[e]pyrene (B[e]P), B[b]F, B[k]F, B[a]P, dibenzo[a,l]pyrene (DB[a,l]P), dibenz[a,h]anthracene (DB[a,h]A), B[g,h,i]P and I[1,2,3-c,d]P) from water samples. The influence of the different experimental parameters (e.g. ionic liquid, disperser solvent, extraction time, ionic strength, etc.) on the yield of the sample preparation step were investigated and operating conditions were optimised. Moreover, the extraction efficiency of the optimised method is compared with that achieved by a previously reported LLE method [9]. To the best of our knowledge, IL-DLLME has not been yet applied to the extraction of PAHs from water samples.

Finally, the applicability of the proposed method was tested by the determination of PAHs in some real drinking and environmental waters (tap, bottled, fountain, well, river, rainwater and treated and raw wastewaters).

2. EXPERIMENTAL

2.1. Reagents, standards and materials

Glass tubes (15 mL volume) with a conic bottom and a screw cap, furnished with a PTFE-lined septum, were acquired from Afora (Barcelona, Spain) and a 100 μ L Hamilton microsyringe was supplied by Supelco (Bellefonte PA, USA).

HPLC chromatographic separations were developed in a system comprising a 600E pump with a gradient controller (Waters, Milford, MA, USA) and a fluorescence detector (HP Series 1100, Agilent, Waldbronn, Germany). The injector (Rheodyne Model 7725i, Cotati, CA, USA) was fitted with a 20 μ L loop. Analytical column temperatures were controlled with a MetaTherm 9540 oven, (MetaChem, Torrance, CA, USA). The analytical column was a 250 mm x 4.6 mm I.D. Waters PAH C₁₈ column, (particle size 5 μ m). A Waters guard-pak, with Nova-Pak C₁₈ inserts, was used to protect the analytical column (both purchased from Waters). Agilent Chemstation Software (Rev. A. 06.03 [509]) was used for data acquisition.

A Unicen (Orto-Alresa, Madrid, Spain) centrifuge was used to centrifuge the cloudy water solutions. An ultrasonic water bath was purchased from Selecta Ultrasounds (Barcelona, Spain). A Turbo Vap II automated nitrogen evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA) was used to evaporate the extracts obtained by LLE.

1-Hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₆MiM][PF₆]) (99%) and 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₈MiM][PF₆]) (98+%) were purchased from Acros Organics (Geel, Belgium) and 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ([C₄MiM][PF₆]) (96+%) was obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain).

Acetonitrile and methanol (gradient-grade, Lichrosolv), dichloromethane (DCM) and acetone (Suprasolv) and 2-propanol (analysis-grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was produced by means of a Milli-Q system supplied by Millipore (Bedford MA, USA). Anhydrous sodium sulphate was supplied by Panreac (Barcelona, Spain). Sodium chloride (NaCl) was supplied by Prolabo (Fontenay-Sous-Bois, France). EPA-610 polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and B[e]P (solid, 98.5%) were supplied by Supelco. 5-MC (10 μ g mL⁻¹) and DB[a,l]P (10 μ g mL⁻¹) were from Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany). Durapore filters (Millex GV, 13 mm, 0.22 μ m), glass fibre filters and 0.45 μ m micropore membranes were supplied by Millipore.

2.2. Samples

Nine water samples were selected for validating the optimised method. These include tap, bottled, fountain and well waters, rainwater, two contaminated not drinking river waters, treated wastewater and raw wastewater.

Tap water was collected from our own laboratory after flowing for 10 min. Bottled water was acquired from a local market. Fountain, well, river waters and rainwater were taken from different points of Galicia (northwest Spain). The treated and raw wastewaters were obtained from a wastewater treatment plant (WWTP) also located in Galicia.

All samples were collected in amber glass bottles, stored in the dark at 4 °C and analyzed within 48 h of collection. The treated and raw wastewaters were firstly filtered through glass fibre filters and secondly through a 0.45 µm micropore membranes. It should be stressed that to avoid losses of PAHs during storage and manipulation and ensure consistent recoveries, 10% (v/v) of 2-propanol was added to the sample waters containers before samples collection.

2.3. Sample preparation

2.3.1. DLLME procedure

Under the finally optimised conditions, a 10 mL aliquot of the water sample containing 10% (v/v) of 2-propanol was placed in a conical bottom glass tube. DLLME was performed by a rapid injection of 1 mL acetone (disperser solvent), containing 50 µL of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (extraction solvent), to the water sample using a micropipette. It should be noted that the extraction mixture was prepared beforehand by weighting with analytical balance, because of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ is too viscous to be exactly transferred by micropipette or syringe.

The injection of the extraction mixture led to a cloudy sample solution. Then, the tube was cooled in an ice-water bath for 2 min to enhance the extraction of PAHs from the sample solution into the tiny droplets of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$.

The final step of the microextraction procedure was centrifugation (5 min at 4000 rpm) to collect the dispersed ionic liquid in the bottom of the conical test tube. The upper aqueous phase was removed with a Pasteur pipette and the

volume of sedimented phase ($27 \pm 1 \mu\text{L}$) was measured using a $100 \mu\text{L}$ microsyringe. The ionic liquid extract is too viscous to be injected directly in the HPLC system, thus it was diluted with methanol to 0.5 mL . Then, the extract was filtered through a $0.22 \mu\text{m}$ Durapore filter and $20 \mu\text{L}$ were injected into the HPLC system.

2.3.2. LLE procedure

Some water samples (well, rainwater and raw wastewater) were also analysed according to a previously reported liquid-liquid extraction method for PAHs [9]. Briefly, this procedure involves the LLE with dichloromethane, followed by drying the organic extract with anhydrous sodium sulphate, concentration of extract under nitrogen stream and final solvent exchange to acetonitrile.

2.4. Chromatographic separation

A binary solvent system made of acetonitrile and water was used for chromatographic separations at 1.5 mL min^{-1} . The gradient elution program was as follows: initial conditions, 50% acetonitrile for 3 min, then a linear ramp to 100% acetonitrile within 17 min and holding at 100% for 8 min. The column temperature was set at 35°C . Detection was performed at selected fluorescence wavelength programming to obtain the better sensitivity and minimal interference. The excitation/emission wavelengths pairs (nm) were set as follows: 267/330 for Naph; 275/315 for Ace and Flu; 247/357 for Phe; 238/418 for Anth, Flt and Pyr; 286/410 for B[a]A, Chry and 5-MC; 294/425 for B[e]P, B[b]F, B[k]F, B[a]P, DB[a,l]P, DB[a,h]A and B[g,h,i]P; and 245/500 for I[1,2,3-cd]P.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The extraction efficiency of IL-DLLME procedure depends of some important experimental parameters which should be investigated in detail. The effects of addition of organic solvent, type and volume of extraction solvent, type and volume of disperser solvent, effect of the salt addition, extraction time and centrifugation time were studied. In order to evaluate the above-cited factors, enrichment factors (EFs) and extraction recoveries have been used. EFs were defined as the ratio between the concentration of each compound in the settled phase and the initial

concentration of analyte in the aqueous sample. Recoveries were calculated as the product of EFs by the ratio between the volumes of the sedimented phase and the water sample, multiplied by 100. Optimization of IL-DLLME conditions was performed using ultrapure water samples spiked with PAHs concentrations between 1 and 15 $\mu\text{g L}^{-1}$, depending on the considered species and each data point was obtained from the mean value of three extractions.

3.1. Optimisation of conditions for dispersive liquid-liquid microextraction

3.1.1. Operational parameters

IL-DLLME is known to be a fast method, in which the more time consuming steps are usually the extraction and centrifugation of the sample solution. Thus, both parameters were firstly studied in order to reduce the time in further experiments.

A series of experiments were carried out using different extraction ways in the IL-DLLME method. Fig. 1 compares the recovery values obtained by using manual shaking, ice-water bath, leave to stand and sonication. Efficient extractions were achieved with manual shaking, sonication and ice-water bath. Thus, on the basis of simplicity and lower cost of proposed method, in further experiments, the sample solution was cooled with ice-water bath.

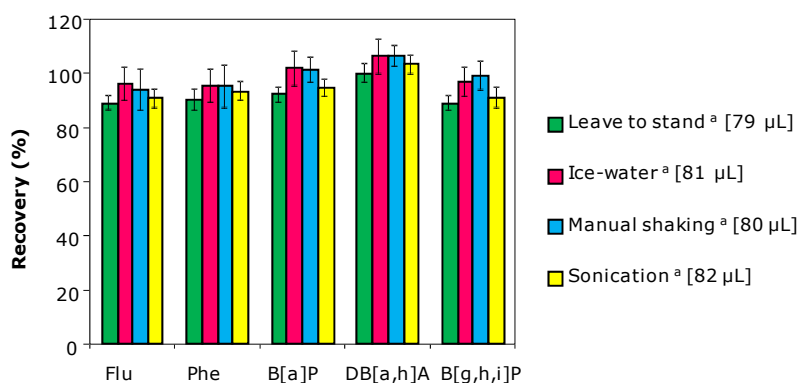


Fig. 1 Recoveries of some representative PAHs in spiked ultrapure water with different extraction modes, during the optimisation step. IL-DLLME conditions were 10 mL of water sample containing 10 % (v/v) of 2-propanol; 1 mL acetone as disperser solvent, 100 μL of $[\text{C}_8\text{Mim}][\text{PF}_6]$ as extraction solvent and centrifugation for 5 min at 4000 rpm. Values in brackets correspond to settled phase volume; data for triplicate extractions; ^a 2 min.

The extraction involves a transferring process of target compounds from the aqueous phase into the ionic liquid phase which is time dependent. Thus, extraction time is one of the most important factors in most of the extraction procedures, especially in microextraction methods such as SPME and LPME.

In this experiment, extraction time means the time from the moment that the solution containing the acetone- $[\text{C}_8\text{mim}][\text{PF}_6]$ mixture was put into ice water bath until starting to centrifuge. To evaluate the optimum extraction time, experiments were carried out in a period of 0, 1, 2, 5, 10, 20, 30 and 40 min, respectively. Other experimental conditions were 10 mL of water containing 10% (v/v) of 2-propanol, 1 mL of acetone as disperser solvent, 100 μL of $[\text{C}_8\text{mim}][\text{PF}_6]$ as extraction solvent and centrifugation for 5 min (4000 rpm).

The results indicated that the extraction equilibrium was attained within 2 min and longer extraction time would not affect the extraction efficiency appreciably. In further experiments, the cloudy solution was just allowed to stand into ice-water bath for 2 min before being centrifuged.

The centrifugation also plays an important role in the separation procedure. The ionic liquid settled in the conic tube bottom during this process. In order to investigate the centrifugation time, experiments were performed by centrifuging for 5, 10 and 20 min at 4000 rpm after extraction. Similar results were achieved using centrifugation times comprised between 5 and 20 min. Thus, the lower value (5 min) was selected to speed up sample preparation. On the other hand, assays performed with centrifugation times lower than 5 min provided unsatisfactory results.

Another important factor to consider in the development of an extraction method for PAHs is their strong adsorption onto the surface of containers, which is a consequence of their high hydrophobicity and results in considerable losses of these pollutants during storage of samples [29]. The adsorption can be prevented by the addition to the sample of an organic solvent [30] (e.g. acetonitrile, 2-propanol or methanol) in percentages between 10% and 40% (v/v), but its effect on efficiency of IL-DLLME process must be checked.

In order to evaluate this effect, different solvents (methanol, acetonitrile and 2-propanol) were tested in the present paper. 10 mL of Milli-Q water with 10% (v/v) of organic solvents previously mentioned were analysed by IL-DLLME. Comparison of the data obtained revealed similar recovery values for 2-propanol (91-101%), acetonitrile (88-103%) and methanol (79-102%). However, lower settled phase volumes and consequently higher EFs (Fig. 2) were obtained with 2-propanol; therefore, 2-propanol was chosen and used in further experiments.

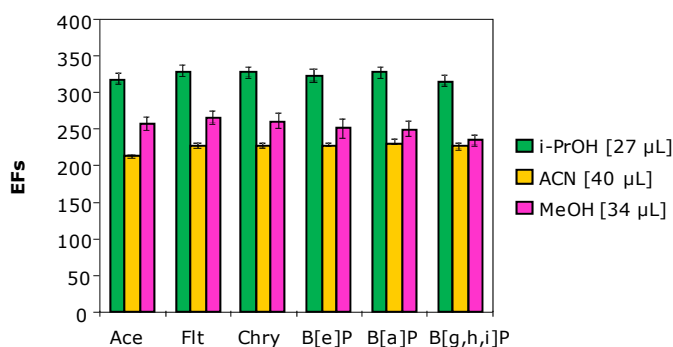


Fig. 2 Influence of the addition of different organic solvents on the enrichment factors of the IL-DLLME method. Data for 10 mL of water using 1 mL of acetone containing 50 µL of $[C_8MIM][PF_6]$. Extraction in an ice-water bath for 2 min; centrifugation for 5 min (4000 rpm). Mean values for $n=3$ replicates. Values in brackets correspond to settled phase volume; EFs, enrichment factors; i-PrOH, 2-propanol; ACN, acetonitrile, MeOH, methanol.

Table 1 Recoveries \pm RSD (%) achieved for different volumes of organic solvent.

Compound	Without addition [36 μ L] ^a	5 % i-PrOH [36 μ L] ^a	10 % i-PrOH [27 μ L] ^a	15 % i-PrOH [20 μ L] ^a	20 % i-PrOH [10 μ L] ^a
Naph	92.8 \pm 0.2	89.7 \pm 1.7	91.3 \pm 0.1	66.9 \pm 4.8	42.0 \pm 12.5
Ace	96.6 \pm 0.3	91.0 \pm 4.6	96.9 \pm 0.1	76.3 \pm 4.8	51.3 \pm 11.2
Flu	99.8 \pm 1.2	95.6 \pm 1.8	98.1 \pm 0.4	81.5 \pm 4.3	56.3 \pm 10.5
Phe	98.9 \pm 0.3	89.2 \pm 13.1	99.9 \pm 0.6	86.3 \pm 5.2	61.1 \pm 10.8
Anth	97.0 \pm 0.6	94.8 \pm 2.0	98.7 \pm 0.3	84.3 \pm 5.0	60.9 \pm 9.6
Fluor	96.5 \pm 0.5	93.5 \pm 4.2	100.2 \pm 0.5	86.7 \pm 5.4	63.8 \pm 9.9
Pyr	85.9 \pm 1.3	86.5 \pm 2.9	101.3 \pm 0.8	86.6 \pm 8.1	63.1 \pm 10.2
B[a]A	89.0 \pm 1.0	88.7 \pm 3.1	98.3 \pm 0.3	87.7 \pm 5.0	66.9 \pm 8.7
Chry	89.6 \pm 1.2	89.2 \pm 3.5	99.7 \pm 0.4	87.9 \pm 5.3	66.1 \pm 8.8
5-MC	89.6 \pm 1.2	90.9 \pm 2.4	98.2 \pm 1.1	88.6 \pm 4.6	67.2 \pm 9.2
B[e]P	87.8 \pm 0.7	87.7 \pm 3.0	98.2 \pm 0.7	87.9 \pm 6.2	66.9 \pm 9.2
B[b]F	88.3 \pm 0.6	88.8 \pm 2.2	97.0 \pm 0.3	88.0 \pm 5.1	67.1 \pm 8.6
B[k]F	87.7 \pm 1.1	88.7 \pm 3.0	96.9 \pm 0.2	89.0 \pm 5.3	67.7 \pm 8.6
B[a]P	87.6 \pm 0.4	88.5 \pm 2.4	99.4 \pm 0.5	89.6 \pm 5.7	68.0 \pm 8.5
DB[a,l]P	82.5 \pm 1.0	82.4 \pm 2.5	92.7 \pm 0.6	87.6 \pm 6.6	66.1 \pm 8.7
DB[a,h]A	81.9 \pm 0.5	81.6 \pm 2.2	90.9 \pm 0.3	86.3 \pm 5.8	64.7 \pm 8.6
B[g,h,i]P	80.9 \pm 1.2	81.4 \pm 4.0	95.9 \pm 0.2	88.1 \pm 6.8	66.3 \pm 8.6
I[1,2,3-cd]P	84.2 \pm 1.5	87.8 \pm 1.8	93.3 \pm 1.0	85.8 \pm 4.0	64.2 \pm 7.5

Data for 9 mL of water (adding different volumes of organic solvent) using 1 mL of acetone containing 50 μ L of [C8MIM][PF₆]. Extraction in an ice-water bath for 2 min; centrifugation for 5 min (4000 rpm); n=3 replicates. ^a Volume of the settled phase; i-PrOH: 2-propanol.

Different percentages of 2-propanol were also assayed in order to evaluate the organic solvent effect on the yield of the IL-DLLME process. Fortified aqueous samples were analysed with IL-DLLME after previous 2-propanol addition (0%, 5%, 10%, 15% and 20% (v/v)). Results demonstrated that 2-propanol concentration was a critical parameter. As can be seen in Table 1, for most of the analytes, the recovery values increased with 2-propanol concentration, probably because the addition of 2-propanol decreased the adsorption of PAHs on the tube surface. Another possible reason is that the addition of 2-propanol increased the diffusion rate of PAHs from water sample to IL. However, the recovery values as well as the settled phase volume, decreased when 2-propanol percentages were higher than 10%. This fact could be due to the increase of PAHs solubility in the 2-propanol-water mixture and subsequent reduction of PAHs partitioning in favour of the IL. Taking into account these results, a percentage of 10% (v/v) of 2-propanol was adopted as the maximum allowable in the following studies.

3.1.2. Type and volume of extraction solvent

The selection of an appropriate extraction solvent has a main role in DLLME process, in order to achieve good recovery, EFs and selectivity of the target compounds. Therefore, kind and volume of the solvent was studied and optimised.

Extraction solvent should have special characteristics including low solubility in water, extraction capability of interested compounds, higher density than water and it should also show a good chromatographic behaviour. Most of the halogenated solvents applied in DLLME have all of above properties, but these compounds are highly toxic and their use is not desirable. ILs represent a good and efficient alternative for the conventional organic chlorinated solvents in DLLME procedure.

In this study, three ILs including $[\text{C}_4\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (density, 1.36 g mL^{-1}), $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (density, 1.29 g mL^{-1}) and $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (density, 1.22 g mL^{-1}) were compared as extraction solvents. The alkyl part of the 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate has significant influence on its physical and chemical properties, such as density, viscosity, and solubility [31] that might affect the extraction efficiency of target analytes.

In order to evaluate the effect of extraction solvent, a series of sample solutions were tested using 1 mL of acetone containing 100 μL of ionic liquid. Significant differences were not found between $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$ and $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ whereas low recovery values (29.6-48.9%) were obtained when $[\text{C}_4\text{MiM}][\text{PF}_6]$ was tested as extraction solvent (data not shown). Moreover, sedimented phase volumes lower than 5 μL were obtained, causing predictable difficulties and systematic errors in its removal with a microsyringe. Therefore, $[\text{C}_4\text{MiM}][\text{PF}_6]$ was not further considered.

Preliminary assays demonstrated that the extraction step (ice-water bath) was important in terms of maximising recoveries of PAHs. Thus, $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$ and $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ provided similar satisfactory results when the ice-water bath extraction step was included in the analytical procedure, so no clear distinction between both extractants can be made. Therefore, in a second series of experiments, the extraction capability of $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$ and $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ was evaluated in absence of the ice-water bath extraction step. To do this, 10 mL spiked water samples were extracted using 1 mL of acetone containing 100 μL of

each IL extractant. The injection of the extraction mixture led to a cloudy sample solution which was centrifuged for 5 min at 4000 rpm. As can be seen in Fig. 3, $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ provides higher extraction efficiency (67.5-87.7%) than $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (21.0-41.9%) when the ice-water bath extraction step is not included in the procedure. Taking into account that the densities and water solubility of 1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate decreases as the 1-alkyl group is lengthened, it seems reasonable that hydrophobic compounds such as PAHs exhibit more affinity for $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$, which was finally selected as extractant.

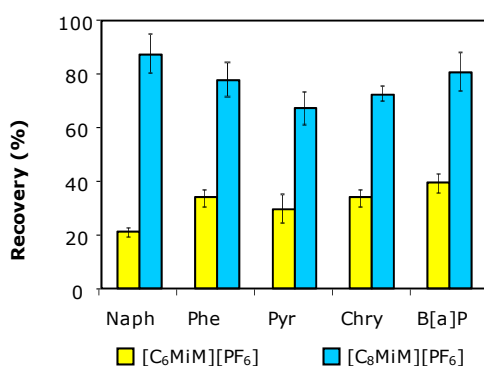


Fig. 3 Influence of extraction solvent on the recovery of some representative PAHs in spiked ultrapure water by IL-DLLME, using 10 mL of water sample (10 % (v/v) of 2-propanol), 50 μL of ionic liquid and 1 mL of acetone as disperser solvent. Centrifugation 5 min at 4000 rpm. Data for triplicate extraction; $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$, 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate; $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$, 1-hexyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate.

The volume of extraction solvent was another important factor that could affect the extraction efficiency. To examine the effect of the extraction solvent volume, solutions containing different volumes of ionic liquid were subjected to the same IL-DLLME procedure. Thus, the effect of ionic liquid volume on the extraction efficiency was studied by using 1 mL of acetone containing different volumes of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ (20, 30, 40, 50, 60, 80 and 100 μL).

The volume of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ had determined the occurrence of the cloudy state of sample solution. Thus, when 20 μL of $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ were employed, the mixture presented uniform transparent aspect, and no settled phase was visible at the bottom of the conical tube after centrifugation. Phases separation was never observed employing volumes lower than 30 μL .

Fig. 4 depicts the extraction efficiency versus volume of extraction solvent for some representative PAHs. As can be seen, the range of recovery increased gradually when the volume of $[C_8\text{MiM}][PF_6]$ was increased from 30 to 50 μL , remaining constant from 50 to 100 μL , which indicates the quantitative extraction and high distribution coefficients of PAHs in these conditions. Obviously, by increasing the volume of extraction solvent from 50 to 100 μL the volume of settled phase increases (27–81 μL); therefore, enrichment factors decrease from 300–334 to 99–123. Then, 50 μL $[C_8\text{MiM}][PF_6]$ was chosen as the optimum extraction solvent volume in order to obtain high enrichment factor, low detection limit and good recovery, while keeping easy the extracts recoveries and manipulation.

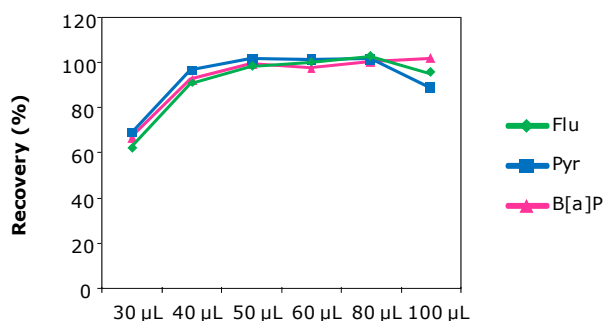


Fig. 4 Effect of the volume of 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate on the recovery of some representative PAHs in spiked ultrapure water obtained by IL-DLLME. Extraction conditions: 10 mL water (10 % (v/v) of 2-propanol), 1 mL of acetone containing different volumes of ionic liquid, extraction in ice-water bath for 2 min and centrifugation for 5 min at 4000 rpm. Mean values for triplicate extraction.

3.1.3. Type and volume of disperser

The extraction solvent will disperse as very fine droplets, when rapidly injected with a disperser solvent in the aqueous sample. Thus, relative miscibility of the disperser solvent with the extraction solvent (ionic liquid) and aqueous phase is the most important factor affecting the selection on disperser solvent. Acetone, acetonitrile and methanol, exhibit adequate properties and were selected as disperser solvent. Then, the effect of these solvents on the performance of IL-DLLME was investigated. For this purpose, a series of sample solutions were studied by using 1 mL of each disperser solvent containing 50 μL $[C_8\text{MiM}][PF_6]$. Experimental data did not show any difference between experiments in terms of recovery, data not given. However, the highest settled phase volume was obtained

when acetonitrile was employed as disperser, and consequently, the enrichment factors were lower for all studied compounds. Significant differences were not found between methanol and acetone; but the less toxicity and the low cost of acetone make it a better choice.

The effect of acetone volume was also investigated. Different volumes of acetone (0.5, 1 and 1.5 mL) were tested to obtain the best results in terms of recovery and EFs. As can be seen in Fig. 5, similar recovery values were obtained when 0.5 and 1 mL were employed. However, the extraction efficiency was considerably reduced with increasing of acetone from 1 to 1.5 mL. On the other hand, by increasing the volume of acetone, the volume of sedimented phase was decreased due to increased solubility of ionic liquid in the sample solutions. Taking into account that enrichment factors are dependent of the yield of the extraction as well as the size of the settled phase, a decreasing of volume of sedimented phase provides a increasing of enrichment factors. Based on these results, 1 mL was chosen as the disperser volume.

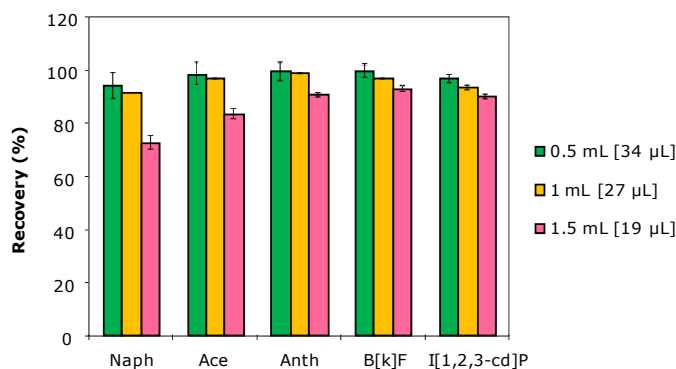


Fig. 5 Influence of the disperser solvent volume on recoveries of the IL-DLLME method. Extraction conditions: sample, 10 mL (10 % (v/v) of 2-propanol); extraction solvent, 50 µL [C₈MiM][PF₆]; disperser solvent, acetone; extraction, ice-water bath (2 min); centrifugation, 5 min (4000 rpm.). Values in brackets correspond to settled phase volume. Data refer to three independent determinations.

3.1.4. Effect of ionic strength

Salt was often added into the sample solution for improving the extraction efficiency in most traditional extraction processes. Thus, the salting-out effect has been commonly used in LLE, SPME and LPME. Generally, addition of salt decreased the solubility of analytes in the aqueous sample and enhances their partitioning into

the adsorbent or organic phase. However, it may have different effect when ionic liquid are used as the extraction solvent.

In this work, the effect of ionic strength on the extraction efficiency of IL-DLLME was evaluated by increasing NaCl concentration from 0% to 20% (w/v) in spiked water samples. The experimental results showed that the efficiencies of IL-DLLME for PAHs extraction were decreased (approximately 10%) with increasing the concentration of NaCl from 0% to 10% reaching a decrease around 45% when the NaCl concentration up to 20%. Regarding settled phase volume, by increasing the ionic strength (from 0% to 15%) the volume remained practically constant whereas it decreased with the NaCl concentration up to 20%.

Ionic liquids can be totally miscible or immiscible with water depending on the substituents on the cation. For example, at room temperature all $[C_n\text{Mim}][\text{PF}_6]$ ionic liquids are insoluble in water whereas halide-based ionic liquids are fully water soluble. Although sodium (Na^+) and chloride (Cl^-) were reported to exhibit low affinity towards the ionic liquids used [32] and their exchange with the cations or anions of ionic liquid should be minor, this should be kept in mind, especially when the ionic liquid is used as solvent. An increasing in salt concentration provides a higher concentration chloride (Cl^-) in the mixture and enhances the solubility of ionic liquid in aqueous phase, decreasing the efficiency of IL-DLLME method.

On basis of these results, salt addition was not used in all subsequent experiments.

3.2. Performance of the analytical procedure

The optimised IL-DLLME procedure was validated with respect to linearity, precision, recoveries, enrichment factors and quantification limits.

Calibration curves were prepared at six levels and each calibration level was injected twice. The range of concentrations and other calibration figures of merit, as well as the detection (LOD, $S/N=3$) and quantification (LOQ, $S/N=10$) limits for the proposed method are summarized in Table 2. The results show that all the analytes were quantified far below the limit imposed by current regulations [7].

Reproducibility was assessed by series of six independent experiments carried out on different days, with spiked ultrapure water. Precision between days are reported in Table 2.

The recovery values and enrichment factors were also investigated on six replicate experiments under the optimal conditions. The extraction process was highly efficient, with excellent recoveries and enrichment factors ranging from 90.3%–103.8% and 301–346, respectively (Table 2).

It should be stressed that the use of IL in DLLME offers important advantages in terms of efficiency, compared to organic chlorinated solvents. Organic solvents employed in DLLME (e.g. CCl_4 or C_2Cl_4) exhibit low miscibility with usual reversed mobile phases. Therefore, solvent evaporation stages are required in order to achieve extracts that can be injected in the chromatograph. Significant losses of some PAHs are produced during the solvent evaporation stages [33] and consequently lower recovery values are obtained for some target compounds. However, ionic liquid allows obtaining a directly analysable extract in a short-single step and solvent exchanges are not required. Thus, IL-DLLME offers the possibility of determining the extracted analytes in a more reproducible way, with extraction yields around 100 % for all studied compounds.

Table 2 Linearity, reproducibility, recoveries, enrichment factors, LODs and LOQs of the proposed analytical procedure.

Compound	Linearity	Reproducibility (RSD %) ^a		Recovery ± SD ^a		EFs ^a		LOQ S/N=3 (ng L ⁻¹)	LOQ S/N=10 (ng L ⁻¹)		
		Calibration range (µg L ⁻¹)	Correlation coefficient	Low level ^b	High level ^c	Low level ^b	High level ^c				
Naph	0.2-200		0.9999	3.7	5.0	98.8 ± 3.7	91.9 ± 0.4	329.2	306.3	0.5	1.7
Ace	0.2-200		0.9999	2.2	4.7	98.2 ± 2.1	91.6 ± 1.0	327.3	305.3	2.0	6.7
Flu	0.05-40		0.9999	1.2	4.5	100.0 ± 1.2	95.2 ± 0.8	333.3	317.4	0.2	0.7
Phe	0.02-20		0.9999	2.9	4.8	101.2 ± 3.0	98.0 ± 1.1	337.2	326.6	0.1	0.4
Anth	0.02-20		0.9997	3.6	4.5	93.9 ± 3.3	98.6 ± 1.8	313.0	328.6	0.2	0.5
Fluor	0.05-40		0.9999	3.5	4.4	95.6 ± 3.4	101.0 ± 2.0	318.6	336.6	0.8	2.5
Pyr	0.02-20		0.9999	4.5	4.5	99.2 ± 4.5	100.1 ± 1.4	330.5	333.7	0.1	0.5
B[a]A	0.02-20		0.9999	2.3	5.7	96.9 ± 2.2	99.8 ± 0.6	323.0	332.6	0.04	0.1
Chry	0.02-20		0.9999	2.1	3.5	102.2 ± 2.2	97.9 ± 1.4	340.8	326.4	0.1	0.5
5-MC	0.02-20		0.9997	3.4	4.4	103.8 ± 3.5	100.2 ± 1.6	346.0	333.8	0.1	0.4
B[e]P	0.05-40		0.9999	3.3	3.8	103.5 ± 3.5	98.7 ± 1.7	345.1	329.0	0.8	2.7
B[b]F	0.05-40		0.9994	4.0	5.1	100.4 ± 4.0	96.7 ± 1.5	334.8	322.2	0.2	0.6
B[k]F	0.02-20		0.9998	3.3	4.1	96.9 ± 3.2	99.7 ± 0.7	323.1	332.3	0.03	0.1
B[a]P	0.02-20		0.9998	3.3	2.5	94.8 ± 3.1	101.5 ± 0.9	315.9	338.2	0.04	0.1
DB[a,i]P	0.02-20		0.9997	2.6	4.3	103.6 ± 2.7	94.7 ± 1.6	345.3	315.6	0.2	0.5
DB[a,h]A	0.05-40		0.9996	3.6	4.8	98.4 ± 3.5	90.3 ± 1.4	327.9	300.8	0.1	0.3
B[g,h,i]P	0.05-40		0.9997	2.9	4.4	101.6 ± 2.9	98.9 ± 0.8	338.7	329.6	0.1	0.2
I[1,2,3-c,d]P	0.02-20		0.9997	2.9	2.3	102.9 ± 2.9	100.1 ± 0.8	342.3	333.6	0.5	1.6

^a n=6 replicates. ^b Ultrapure water spiked with PAHs at concentrations from 0.4 to 6 $\mu\text{g L}^{-1}$. ^c Ultrapure water spiked with PAHs at concentrations from 0.002 to 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$; EFs, enrichment factors.

Possible matrix effects of DLLME were evaluated by extracting samples of ultrapure, tap, bottled, fountain, well, rainwater, river, treated and raw wastewater spiked with target analytes at two addition levels ($0.002\text{--}0.02\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$ and $0.4\text{--}6\text{ }\mu\text{g L}^{-1}$). Except in case of ultrapure water, the response for each compound was corrected with that corresponding to non-spiked aliquots of the same sample. Spiked and non-spiked fractions were processed in triplicate and the extraction efficiency was compared with that achieved for ultrapure water with the same addition level. Table 3 shows the effect of the type of matrix on the performance of the method at high addition level, but it should be stressed that comparable results were achieved with both studied addition levels. Obtained results indicated that the efficiency of DLLME process was affected by the nature of water samples. In case of tap, well, fountain, bottled and rainwater, the efficiency of the DLLME remained the same as that achieved for ultrapure water, therefore, quantification can be performed by external calibration.

However, a 30% diminution in the response of some PAHs was noticed in the river samples; consequently, the standard addition method is recommended for this type of matrix. As expected, the extraction yield of PAHs underwent a progressive and significant reduction with the increase in the complexity of the samples. In case of treated wastewater the decrease in the efficiency of the extraction was about 40% for some target compounds, whereas as much as a 60% diminution was found in raw wastewater. Therefore, quantification always requires use the standard addition method in this type of samples.

Table 3 Evaluation of possible matrix effects of the IL-DLLME method.

Compound	Relative recovery (%) ^a ± SD								
	Tap	Bottled	Fountain	Well	Rainwater	River 1	River 2	Treated wastewater	Raw wastewater
Naph	98.3 ± 2.0	98.3 ± 0.2	100.2 ± 0.3	104.8 ± 4.4	98.5 ± 1.2	71.4 ± 0.6	82.2 ± 0.1	66.7 ± 0.7	56.4 ± 0.3
Ace	102.5 ± 0.2	100.3 ± 0.4	99.5 ± 1.1	106.9 ± 2.4	100.3 ± 0.4	81.7 ± 0.9	83.2 ± 0.5	71.8 ± 0.1	57.7 ± 0.3
Flu	103.3 ± 0.5	98.7 ± 1.5	95.4 ± 0.7	104.8 ± 1.0	95.5 ± 0.2	76.6 ± 0.6	82.9 ± 0.7	66.0 ± 0.5	57.2 ± 0.9
Phe	96.8 ± 6.9	101.1 ± 1.7	93.1 ± 4.2	102.0 ± 3.7	97.0 ± 0.7	76.9 ± 0.3	84.7 ± 0.4	66.1 ± 0.3	49.9 ± 0.5
Anth	94.1 ± 1.1	100.2 ± 0.3	94.6 ± 2.0	101.5 ± 0.2	95.0 ± 0.1	75.7 ± 0.7	86.1 ± 0.1	67.1 ± 0.7	47.8 ± 0.4
Fluor	97.1 ± 6.8	99.9 ± 1.9	94.5 ± 3.4	101.6 ± 1.0	95.7 ± 1.7	74.3 ± 0.7	85.8 ± 0.8	67.3 ± 0.5	49.3 ± 1.1
Pyr	95.7 ± 6.1	101.2 ± 3.7	100.6 ± 5.8	103.9 ± 0.7	100.4 ± 0.9	74.2 ± 0.6	88.2 ± 0.1	64.4 ± 0.5	48.8 ± 0.2
B[a]A	94.6 ± 6.7	96.6 ± 0.6	93.5 ± 1.6	103.5 ± 5.1	92.7 ± 1.0	70.6 ± 0.7	84.2 ± 0.2	62.3 ± 0.3	39.6 ± 0.7
Chry	96.1 ± 6.4	96.4 ± 1.5	93.6 ± 2.3	102.5 ± 5.8	93.6 ± 0.2	70.4 ± 0.2	80.1 ± 1.2	62.2 ± 1.0	36.5 ± 0.6
5-MC	97.1 ± 7.2	95.2 ± 0.9	94.4 ± 1.1	101.4 ± 6.0	93.3 ± 0.2	71.3 ± 0.4	84.3 ± 1.3	61.5 ± 1.0	36.8 ± 0.8
B[e]P	95.8 ± 5.4	96.2 ± 0.5	94.8 ± 1.3	103.6 ± 6.3	95.4 ± 0.9	69.3 ± 0.2	82.7 ± 1.9	62.0 ± 0.6	47.3 ± 0.7
B[b]F	96.8 ± 5.3	96.7 ± 1.5	94.4 ± 1.2	101.2 ± 1.8	94.1 ± 3.1	70.4 ± 0.3	82.3 ± 0.3	61.2 ± 0.7	30.4 ± 0.4
B[k]F	97.8 ± 6.4	98.3 ± 2.0	94.2 ± 1.8	101.2 ± 0.8	95.6 ± 0.6	68.9 ± 0.1	83.5 ± 0.2	62.7 ± 0.2	35.8 ± 0.3
B[a]P	92.1 ± 2.7	100.2 ± 2.8	96.8 ± 2.5	102.1 ± 0.5	97.7 ± 2.0	72.7 ± 0.2	87.2 ± 0.2	64.3 ± 0.3	37.5 ± 0.2
DB[a,l]P	99.3 ± 1.5	98.7 ± 3.3	97.4 ± 0.4	105.3 ± 4.7	99.1 ± 1.2	74.2 ± 0.8	84.7 ± 1.2	64.9 ± 1.0	33.3 ± 0.5
DB[a,h]A	100.6 ± 0.8	101.4 ± 1.4	100.3 ± 0.4	102.2 ± 2.5	100.4 ± 0.4	75.9 ± 0.2	80.3 ± 0.3	61.8 ± 0.4	34.3 ± 0.2
B[g,h,l]P	95.6 ± 5.7	97.2 ± 1.3	92.9 ± 1.7	99.3 ± 1.9	92.9 ± 2.9	72.0 ± 0.3	80.8 ± 0.5	61.9 ± 0.2	36.4 ± 0.9
I[1,2,3-c,d]P	97.1 ± 4.6	97.1 ± 1.5	94.8 ± 2.4	101.2 ± 2.3	95.2 ± 0.6	73.6 ± 1.1	85.1 ± 0.6	60.1 ± 0.8	33.1 ± 0.4

^a Relative recovery to those achieved for ultrapure water. Addition level 0.4–6 µg L⁻¹; n=3 replicates.

In addition to the use of spiked samples, the extraction efficiency of the IL-DLLME method was compared with that achieved by a previously validated LLE procedure [9]. As can be seen in Table 4, for spiked ultrapure water, well water and rainwater, IL-DLLME provides similar or higher recoveries for all species than LLE. However, low extraction efficiencies were obtained for raw wastewater. Probably, this behaviour could be explained by the matrix effects since the presence of colloidal organic matter in water samples is shown to significantly reduce the extraction efficiency [11].

Table 4 Relative recoveries to those achieved by LLE for water samples.

Compound	Relative recovery (%) \pm S.D.			
	Spiked ultrapure water ^a	Well water	Rainwater	Spiked raw wastewater ^a
Naph	94.6 \pm 4.9	97.1 \pm 7.5	92.5 \pm 4.8	50.1 \pm 0.3
Ace	93.9 \pm 2.0	97.9 \pm 4.5	113.8 \pm 13.3	51.6 \pm 0.3
Flu	97.5 \pm 1.0	n.d	n.d	55.1 \pm 0.9
Phe	100.4 \pm 1.9	102.4 \pm 3.6	151.7 \pm 9.1	46.4 \pm 0.5
Anth	100.8 \pm 1.3	100.6 \pm 2.3	n.d	46.8 \pm 0.4
Fluor	102.8 \pm 0.1	104.0 \pm 2.5	n.d	51.0 \pm 1.1
Pyr	102.9 \pm 1.5	107.5 \pm 10.0	137.9 \pm 6.2	50.5 \pm 0.2
B[a]A	102.7 \pm 3.0	n.d	n.d	41.1 \pm 0.7
Chry	99.1 \pm 0.9	n.d	n.d	34.6 \pm 0.6
5-MC	101.1 \pm 1.6	n.d	n.d	37.9 \pm 0.9
B[e]P	100.6 \pm 2.1	n.d	n.d	48.2 \pm 0.7
B[b]F	99.5 \pm 2.7	98.7 \pm 10.3	n.d	30.1 \pm 0.4
B[k]F	102.2 \pm 1.6	103.4 \pm 12.4	n.d	36.7 \pm 0.3
B[a]P	102.8 \pm 0.1	106.0 \pm 5.9	n.d	39.2 \pm 0.2
DB[a,l]P	98.0 \pm 1.2	n.d	n.d	32.6 \pm 2
DB[a,h]A	93.6 \pm 1.4	n.d	n.d	32 \pm 0.6
B[g,h,i]P	101.5 \pm 0.3	106.4 \pm 11.7	n.d	37.3 \pm 0.9
I[1,2,3-cd]P	101.7 \pm 0.5	n.d	n.d	33.5 \pm 0.4

^a Addition level 0.4-6 $\mu\text{g L}^{-1}$; n=3 replicates; n.d., not detected.

Matrix effects of LLE were also evaluated by extracting samples of raw wastewater spiked with target compounds. The obtained results indicated that the efficiency of LLE process was affected in a minor extension by nature of water samples than IL-DLLME. Thus, recovery values between 52% and 86% were obtained by LLE whereas values between 30% and 58% were achieved by IL-DLLME in case of raw wastewater.

Finally, Table 5 summarizes the analytical characteristics of previously published extraction techniques for the determination of PAHs in water samples. IL-DLLME, LPME and SBSE gave significantly higher recovery values. However, LPME method exhibits high quantification limits, while the SBSE method requires high extraction times, increasing the overall sample treatment time. The remaining methods provide lower recovery values, probably due to losses of some PAHs in solvent evaporation process in LLE or drying of cartridges in SPE. The previously reported DLLME method shows lower recovery and higher quantification limits than the proposed procedure. Thus, the optimised IL-DLLME procedure appears to be an advantageous alternative when compared to the other extraction techniques, with the advantages of being faster, simple and using smaller volumes of organic solvents.

Table 5 Comparative data of the developed IL-DLLME method with other procedures described in literature for the determination of PAHs in water samples.

Parameters	LLE [8]	LLE [9]	SPE [10]	SPME [11]	SBSE [12]	LPME [13]	LPME [14]	DLLME [15]	IL-DLLME proposed method
Sample amount (mL)	300	250	50	18	100	3	15	5	10
Extraction solvent	Hex	DCM	Hex-DCM	Not required	Not required	Tol	[C ₈ MIM][PF ₆]	C ₂ Cl ₄	[C ₈ MIM][PF ₆]
Solvent consumption (mL) ^a	77	90	5	Not required	Not required	0.003	0.003	0.008	0.05
Extraction time (min) ^b	72	6	50	70	720	20	30	Seconds	2
Determination technique	HPLC-Flu	HPLC-Flu	HPLC-Flu	GC-MS/MS	GC-MS	HPLC-UV	HPLC-Flu	GC-FID	HPLC-Flu
Extraction efficiency (%)	81-106	51-104	67-99	60-102	90-104	89-102	-	60-111	90-102
Precision (RSD %)	<14	<11	<5	<14	<15	<9	<12	<11	<6
LOQ (ng L ⁻¹)	0.1-0.4	0.1-4.4	0.7-56.2	0.1-1.0	0.3-9.5	3333.3-11666.7 ^c	-	23.3-100.0 ^c	0.1-7.0
PAHs number ^d	15	15	17	27	8	6	12	16	18

^a Solvent consumption only in extraction stage; solvent consumption in clean-up, solvent exchanges and cartridges activation not included. ^b Time employed in extraction stage; any other operations were not included. ^c Values calculated considering data provided by authors in the paper. ^d Number of PAHs studied in each procedure. Hex, n-hexane; Hex-DCM, hexane-dichloromethane (50:50,v/v) mixture; Tol, toluene; GC-MS/MS, gas chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry; HPLC-UV, HPLC-UV detection; - not available.

3.3. Application to real water samples

The applicability of the proposed IL-DLLME method was tested by the determination of PAHs in nine different water samples (tap, bottled, fountain, well, two contaminated rivers, rainwater, treated and raw wastewater). It is interesting to note that three different samples (well water, rainwater and raw wastewater) were also processed by an alternative technique (LLE) [9]. Obviously, standard addition protocol was used as quantification technique to samples that showed matrix effects (river samples, treated wastewater and raw wastewater), whereas external calibration was employed with remaining water samples.

As can be seen in Table 6, the PAHs levels were well below the maximum allowed concentrations in all tested samples. Total concentrations (sum of 18 PAH) between 127.8 and 413.2 ng L⁻¹ were found in drinking waters (tap, bottled, fountain, well) whereas rainwater exhibited concentration values between 7.1 and 110.6 ng L⁻¹. Low concentrations of PAHs were found in river samples but it should be noticed that the river samples were collected during a rainy period. Fig. 6 depicts typical chromatograms obtained for spiked and non-spiked well water samples working in the optimal conditions described.

Table 6 Concentration of PAHs found in different water samples by IL-DLLME procedure.

Compound	Tap	Bottled	Fountain	Well	Rainwater	River 1	River 2	Treated wastewater
Naph	89.4 ± 1.7	174.5 ± 1.5	84.1 ± 2.1	245.2 ± 7.7	110.6 ± 5.2	n.d.	n.d.	269.2 ± 12.1
Ace	27.0 ± 0.1	43.0 ± 4.7	38.8 ± 2.6	65.0 ± 4.6	34.9 ± 11.7	n.d.	n.d.	501.1 ± 10.4
Flu	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	606.1 ± 5.1
Phe	5.5 ± 0.1	30.9 ± 7.4	5.9 ± 2.0	47.8 ± 3.5	18.8 ± 6.0	9.9 ± 11.8	n.d.	40.0 ± 4.0
Anth	n.d.	n.d.	n.d.	8.1 ± 2.3	n.d.	n.d.	n.d.	16.4 ± 1.0
Fluor	n.d.	n.d.	n.d.	19.7 ± 2.5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Pyr	3.7 ± 0.2	9.6 ± 8.2	6.3 ± 8.2	15.0 ± 9.3	7.1 ± 4.5	n.d.	8.7 ± 1.0	12.8 ± 0.3
B[a]A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Chry	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5-MC	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B[e]P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B[b]F	n.d.	n.d.	n.d.	5.0 ± 10.4	n.d.	n.d.	n.d.	14.9 ± 1.1
B[k]F	n.d.	n.d.	n.d.	0.8 ± 11.6	n.d.	n.d.	n.d.	2.0 ± 2.5
B[a]P	n.d.	n.d.	n.d.	3.5 ± 5.5	n.d.	n.d.	n.d.	2.4 ± 0.9
DB[a,i]P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
DB[a,h]A	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
B[g,h,i]P	2.2 ± 0.4	2.4 ± 1.0	2.8 ± 7.3	3.1 ± 11.0	n.d.	n.d.	n.d.	8.4 ± 2.2
I[1,2,3-c,d]P	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
ΣPAHs	127.8	260.4	137.8	413.2	171.3	9.9	8.7	1473.2

Average (ng L⁻¹) ± relative standard deviation (RSD %); n=3 replicates per sample; n.d., not detected; ΣPAHs, sum of 18 PAHs considered in this study.

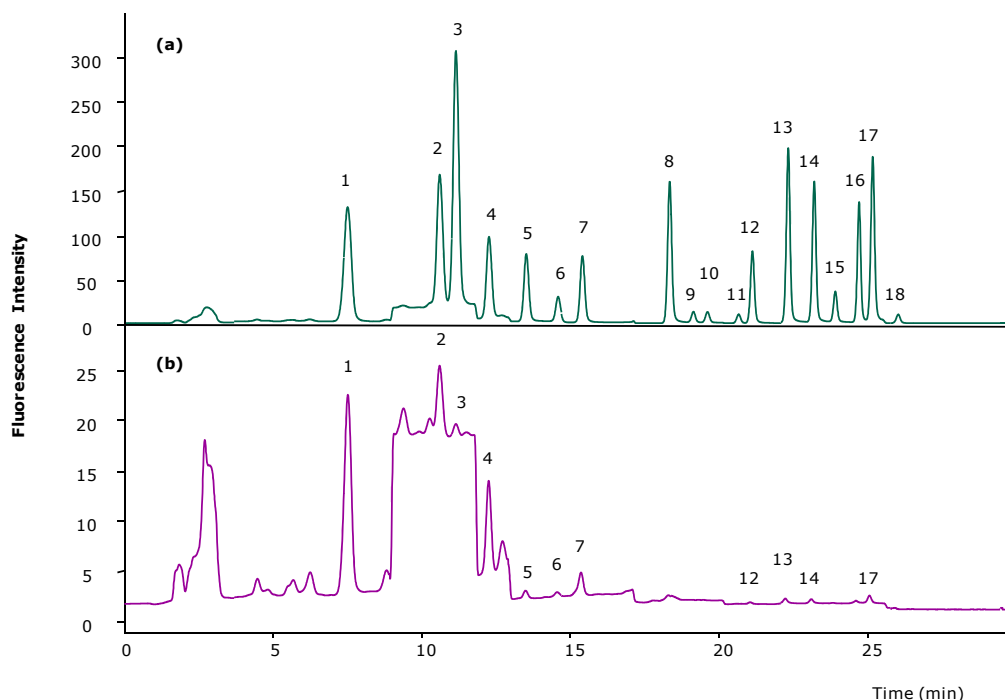


Fig. 6 Chromatograms obtained by HPLC-fluorescence detection, corresponding to (a) spiked well water at concentrations from 0.4–6 $\mu\text{g L}^{-1}$ and (b) non-spiked well water extracts obtained using IL-DLLME developed procedure. Peak assignment: (1) Naph, (2) Ace, (3) Flu, (4) Phe, (5) Anth, (6) Flt, (7) Pyr, (8) B[a]A, (9) Chry, (10) 5-MC, (11) B[e]P, (12) B[b]F, (13) B[k]F, (14) B[a]P, (15) Db[a,i]P, (16) DB[a,h]A, (17) B[g,h,i]P and (18) I[1,2,3-cd]P.

Treated wastewater exhibited concentrations at levels of 1473.2 ng L^{-1} whereas any target compounds were detected in raw wastewater. Thus, the concentration of target compounds appeared to be higher in the effluent than the influent. This trend matches with that reported by Bergqvist et al [34]. The release of PAHs in the effluents from municipal wastewater treatment plants might increase the environmental contamination by readily bioavailable pollutants in the recipient waters. In some cases, trace concentrations of toxic organic pollutants are also removed, as a side-effect of the intended treatment. The high lipophilicity of PAHs increases their adsorption to the small particles in the wastewater during the treatment process. Thus, pollutants present in the wastewater might re-partition between the water phase and particle phase during the course of the chemical and biological processes involved in the wastewater treatment. The increase in the concentration of these compounds during the treatment process is a concern for the treatment method and maybe also for the outside environment.

Regarding the contribution of each individual PAHs, two- and three- ring compounds such as naph, ace and phen predominate, whereas the concentration of the high-molecular weight (five- and six-ring) compounds remained below 12.3 ng L⁻¹. The most toxic of all PAHs, B[a]P, was only found in well water and treated wastewater at concentration values of 3.5 and 2.0 ng L⁻¹, respectively.

Finally, it should be mentioned that the PAHs concentrations obtained in this study are similar to those found in literature [11, 35].

4. CONCLUSIONS

An analytical methodology for the determination of PAHs in water samples was developed. The high affinity of [C₈MiM][PF₆] to the target analytes permits extraction and preconcentration of the PAHs into one step, offering significant saving of reagents and time compared to other techniques. Additionally, the use of ionic liquid involves some advantages such as the reduction of exposure to toxic solvent, possibility of obtained more reproducible results since evaporation of extractant is not required and obtaining a directly analysable extract in a short-single step.

The wide applicability of the procedure was verified by considering sample matrices of different complexity. Matrix effects were observed when analysing the more complex samples (contaminated river samples, treated wastewater and raw wastewater). Therefore, standard addition protocol was employed as quantification technique in these type of samples, whereas external calibration was used with remaining matrices.

In summary, the developed methodology shows good performance of the analytical protocol, exhibits excellent recoveries for all studied compounds and allows the determination of the PAHs in the low "nanogram per liter" range in a reproducible and simple way.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Spanish Ministry of Education and Science (project CTQ2006-03334/BQU), E.U. FEDER funding and the Xunta de

Galicia (project PGIDIT06PXIB237039PR). T. Pena gratefully acknowledges her doctoral FPI grant from the Spanish Ministry of Education and Science.

REFERENCES

- [1] R.G. Harvey, Polycyclic aromatic hydrocarbons. Wiley-VCH New York 1996.
- [2] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, G.A. 1995.
- [3] United States Environmental Protection Agency, National Primary Drinking Water Standards, 2003. Available in <http://www.epa.gov/safewater>.
- [4] World Health Organization (WHO), Guidelines for Drinking Water Quality, First Addendum to Third Edition, Geneva 2006.
- [5] Directive 98/83/EC, 1998, Official Journal of the European Communities L-330 (5th December, 1998). Council Directive (3rd November, 1998) relative to the quality of waters intended for human consumption.
- [6] Directive 2006/0129 of the European Parliament and of the Council on environmental quality standards in the field of water policy and amending Directive 2000/60/EC, European Commission, Brussels, 2006.
- [7] Directive 2008/105/EC, 2008, Official Journal of the European Communities L-348/84 (24th December, 2008). Council Directive (16th December, 2008) on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council.
- [8] D.M. Brum, R.J. Cassella, A.D. Pereira, Talanta 74 (2008) 1392.
- [9] L. Pensado, E. Blanco, M.C. Casais, M.C. Mejuto, E. Martínez, A.M. Carro, R. Cela, J. Chromatogr. A 1056 (2004) 121.
- [10] O. Delhomme, R. Rieb, M. Millet, Chromatographia 65 (2007) 163.

- [11] V. Fernández, E. Concha, S. Muniategui, P. López, D. Prada, J. Chromatogr. A 1176 (2007) 48.
- [12] C. Huertas, J. Morillo, J. Usero, I. Gracia-Manarillo, Talanta 72 (2007) 1149.
- [13] L. Hou, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 976 (2002) 377.
- [14] J. Liu, G. Jiang, Y. Chi, Y. Cai, Q. Zhou, J. Hu, Anal. Chem. 75 (2003) 5870.
- [15] M. Rezaee, Y. Assadi, M.-R.M. Hosseini, E. Aghaee, F. Ahmadi, S. Berijani, J. Chromatogr. A 1116 (2006) 1.
- [16] M. García, I. Rodríguez, R. Cela, J. Chromatogr. A 1166 (2007) 9.
- [17] H. Farahani, P. Norouzi, R. Dinarvand, M. Reza, J. Chromatogr. A 1172 (2007) 105.
- [18] Y.C. Fan, Z.L. Hu, M.L. Chen, C.S. Tu, Y. Zhu, Chin. Chem. Lett 19 (2008) 985.
- [19] M. Koel, Crit. Rev. Anal. Chem. 35 (2005) 177.
- [20] J. Liu, J.A. Jönsson, G. Jian, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 20.
- [21] A. Berthod, S. Carda-Broch, Annals of Marie Curie Fellowships 3 (2004) 1.
- [22] G.A. Baker, S.N. Baker, S. Pandey, F.V. Bright, Analyst 130 (2005) 800.
- [23] M. Cruz-Vera, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A 1202 (2008) 1.
- [24] V. Pino, Q.Q. Baltazar, J.L. Anderson, J. Chromatogr. A 1148 (2007) 92.
- [25] E. Aguilera-Herrador, R. Lucena, S. Cárdenas, M. Valcárcel, J. Chromatogr. A 1201 (2008) 106.
- [26] Q. Zhou, X. Zhang, J. Xiao, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 4361.
- [27] Y. Liu, E. Zhao, W. Zhu, H. Gao, Z. Zhou, J. Chromatogr. A 1216 (2009) 885.
- [28] Q. Zhou, H. Bai, G. Xie, J. Xiao, J. Chromatogr. A 1188 (2008) 148.

[29] L. Wolska, M. Rawa-Adkonis, J. Namiesnik, *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 1389.

[30] L.H. Keith, *Environmental Sampling and Analysis: A practical guide*, Lewis Publishers, NY, 1991.

[31] S. Chun, S.V. Dzyuba, R.A. Bartsch, *Anal. Chem.* 73 (2001) 3737.

[32] A.E. Visser, R.P. Swatloski, W.M. Reichert, S.T. Griffin, R.D. Rogers, *Ind. Eng. Chem. Res* 39 (2000) 3596.

[33] M.T. Pena, L. Pensado, M.C. Casais, M.C. Mejuto, R. Cela, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2559.

[34] P.-A. Bergqvist, L. Augulyte, V. Jurjonienė, *Water, Air, Soil Pollut.* 175 (2006) 291.

[35] P. Popp, C. Bauer, L. Wennrich, *Anal. Chim. Acta* 436 (2001) 1.

2.1.3. CONSIDERACIONES ADICIONALES Y CONCLUSIONES

En este trabajo se ha desarrollado una metodología analítica basada en DLLME y HPLC-Flu, utilizando un líquido iónico como extractante. Aunque la DLLME ya había sido aplicada anteriormente para la extracción de PAHs en aguas, este método constituye la primera aplicación de DLLME, utilizando un IL como disolvente de extracción de estos analitos.

La elevada afinidad del $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$ por los PAHs, permite llevar a cabo la extracción y concentración de los analitos en una sólo etapa. La mayor longitud de la cadena alquílica presente en el catión imidazolio, le confiere menor solubilidad en agua, que sus homólogos $[\text{C}_4\text{MiM}][\text{PF}_6]$ y $[\text{C}_6\text{MiM}][\text{PF}_6]$, favoreciendo la extracción de los PAHs desde la fase acuosa hacia el $[\text{C}_8\text{MiM}][\text{PF}_6]$.

El uso de un líquido iónico como disolvente de extracción, proporciona ventajas adicionales, frente a los disolventes orgánicos convencionales, ya que se obtiene un extracto compatible con el sistema cromatográfico utilizado, que puede inyectarse directamente sin necesidad de realizar un cambio de disolvente. De este modo se evitan las etapas de evaporación, que generalmente traen como consecuencia pérdidas de los analitos más volátiles. Como consecuencia, se consigue la determinación de los analitos de un modo más reproducible, con rendimientos de extracción entorno al 100% para todos los compuestos estudiados.

La optimización de los parámetros de extracción ha permitido obtener excelentes recuperaciones (**90.3% a 103.8%**) para todos los compuestos estudiados, así como elevados factores de enriquecimiento (**301 a 346**). Mediante la adición de un 10% de 2-propanol en la etapa de muestreo, se evita la adsorción de los PAHs sobre las paredes del recipiente, obteniendo resultados reproducibles (**R.S.D. < 5.7%**).

La metodología propuesta es altamente sensible. Los límites de cuantificación obtenidos, del orden del bajo ng L^{-1} (**0.1-7 ng L^{-1}**) permiten la determinación de los analitos a los niveles establecidos por la EPA y la EU para aguas de bebida y aguas superficiales. Además se trata de un método sencillo, rápido y de bajo coste, tanto en consumo de disolventes como en tiempo de análisis.

2. MUESTRAS ACUOSAS

El método desarrollado se aplicó a la determinación de los PAHs en muestras de agua de diferente complejidad. Como era de esperar, la naturaleza de las muestras y el diferente contenido en materia orgánica, afecta al sistema de extracción. Así, se encontraron efectos matriz en las muestras de agua de río donde se producen vertidos industriales y también en las aguas residuales (influyente y efluente), siendo necesario utilizar el método de adiciones estándar para llevar a cabo su cuantificación. Las muestras de agua de grifo, botella, fuente, pozo y lluvia no presentaron efectos matriz, por lo que cuantificaron mediante calibración externa.

Se ha detectado la presencia de algunos de los analitos estudiados en las muestras acuosas analizadas. El compuesto más tóxico, B[a]P, sólo se encontró en agua de pozo y efluente, a concentraciones de **3.5 y 2.0 ng L⁻¹**, respectivamente; mientras que compuestos de dos o tres anillos como el naftaleno, acenafteno y fenantreno fueron los predominantes.

Los resultados obtenidos mediante la metodología optimizada, se compararon con los obtenidos mediante una técnica convencional, previamente validada (LLE), obteniendo buena concordancia en todos los casos.

En definitiva, el método desarrollado supone una mejora substancial, respecto a los procedimientos recomendados por organismos oficiales como la EPA, tanto en rapidez, en simplicidad de análisis, como en aspectos medioambientales relacionados con la generación de residuos orgánicos. Así, la metodología propuesta puede ser una herramienta de gran utilidad para llevar a cabo los controles de calidad del agua.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

A lo largo del capítulo anterior, se han descrito las conclusiones derivadas de cada uno de los trabajos desarrollados en esta Tesis Doctoral. En este capítulo se recogen una serie de conclusiones generales, y algunas consideraciones a nivel experimental, relacionadas con el comportamiento de los analitos investigados.

El carácter hidrofóbico de los PAHs, ha sido uno de los aspectos que ha generado mayores dificultades desde el punto de vista analítico y experimental. La elevada lipofilia de estos contaminantes origina que se adsorban fuertemente a la materia orgánica de los sólidos medioambientales. Generalmente, para conseguir la extracción cuantitativa de los analitos, se requieren técnicas enérgicas, como por ejemplo, la extracción asistida por microondas o la extracción con líquidos presurizados. Sin embargo, el uso de este tipo de extracciones, con muestras de elevada complejidad, como el caso de los lodos o el material biológico, conduce a una serie de dificultades adicionales, asociadas principalmente a la co-extracción del material lipídico y otros componentes de la matriz de la muestra.

En este sentido, la saponificación de las muestras, ha sido un factor clave, que no sólo ha contribuido a la destrucción de los lípidos, sino que ha favorecido la extracción de los analitos. La adición de un determinado volumen de una disolución alcalina durante el proceso de extracción ha mejorado notablemente la recuperación de los PAHs. Los extractos obtenidos son lo suficientemente limpios, y en la mayoría de los casos, pueden analizarse sin necesidad de etapas de purificación adicionales.

La baja polaridad de los compuestos también plantea dificultades a la hora del análisis de muestras acuosas. Estos contaminantes tienden a adsorberse a las paredes de los recipientes de vidrio que contiene las muestras, lo que conduce a pérdidas importantes de los analitos y a errores en los resultados. La adición de un pequeño porcentaje de disolvente orgánico a las muestras acuosas, soluciona en gran medida este problema. No obstante, es un factor adicional a tener en cuenta durante la optimización, ya que puede afectar al sistema de extracción.

A nivel práctico, la adsorción de los analitos al material de laboratorio, puede generar problemas de contaminación cruzada, por lo que es necesario ser especialmente cuidadoso a la hora del lavado del material. A lo largo de este trabajo, se han ido “descubriendo” algunos materiales que producían problemas en los blancos, como es el caso de las celdas de la extracción con líquidos

V. CONCLUSIONES

presurizados, o los adsorbentes utilizados en la dispersión de la matriz en fase sólida. En todos los casos, se han buscado alternativas sencillas, que permitan obtener blancos reproducibles.

De forma general, se puede concluir que a lo largo de este trabajo se han desarrollado metodologías novedosas, sensibles y selectivas, para la determinación de los PAHs en muestras de interés medioambiental. Las características analíticas de las distintas técnicas, recuperación, precisión y LOQs, mejoran o están al mismo nivel que otros métodos disponibles, y permiten la determinación de los analitos muy por debajo de los límites legislados, en todas las matrices estudiadas. La eficacia de los métodos ha sido validada con materiales de referencia certificados, y las diferentes metodologías han sido aplicadas al análisis de muestras reales.

Las metodologías analíticas propuestas en esta tesis, son trabajos de investigación originales, que han dado lugar a diversas publicaciones en revistas internacionales de elevado interés científico. Además, los métodos aquí desarrollados, han sido mencionados en trabajos de investigación publicados posteriormente por otros autores, y en concreto el método desarrollado para el análisis de matrices biológicas, ha sido utilizado en estudios de contaminación de alimentos [521], lo que indica que se trata de métodos reconocidos a nivel internacional.

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

ADN	Desoxyribonucleic acid	Ácido desoxirribonucleico
AEDT	Ethylenediaminetetracetic acid	Ácido etilendiaminotetracético
ASE	Assisted solvent extraction	Extracción asistida por disolventes
ATSDR	Agency for toxic substances and disease registry	Agencia para sustancias tóxicas y el registro de enfermedades
CAS	Chemical abstract service	---
CBs	Chlorobenzenes	Clorobencenos
CERCLA	Comprehensive environmental response compensation, and liability act	Ley de responsabilidad, compensación y recuperación ambiental
CID	Collision induced dissociation	Disociación inducida por colisión
[C_nMIM] [PF₆]	1-alkyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate	Hexafluorofosfato de 1-alkil-3-metilimidazolio
CPE	Cloud point extraction	Extracción por punto nube
CRM	Certified reference material	Material de referencia certificado
DAD	Diode array detector	Detector de diodos en serie
DDT	Dichloro-diphenyl-trichloroethane	Dicloro-difenil-tricloroetano
DLLME	Dispersive liquid-liquid microextraction	Microextracción líquido-líquido dispersiva
ECD	Electron capture detector	Detector de captura de electrones
EDAR	Sewage treatment plant	Estación depuradora de aguas residuales
EF	Enrichment factor	Factor de enriquecimiento
EI	Electron impact	Impacto electrónico

ACRÓNIMOS

EPA	Environmental Protection Agency	Agencia de protección del medio ambiente
ET-AAS	Electrothermal atomic absorption spectrometry	Espectrometría de absorción atómica electrotérmica
EU	European Union	Unión Europea
FID	Flame ionization detector	Detector de ionización de llama
Flu	Fluorescence detector	Detector de fluorescencia
FPD	Flame photometric detector	Detector fotométrico de llama
GC	Gas Chromatography	Cromatografía de gases
GPC	Gel permeation chromatography	Cromatografía de permeación en gel
HF-LPME	Hollow fiber-liquid phase microextraction	Microextracción en fase líquida con fibra hueca
HPLC	High performance liquid chromatography	Cromatografía líquida de alta resolución
IARC	International agency for research on cancer	Agencia internacional de investigación del cáncer
ICP	Inductively coupled plasma	Plasma de acoplamiento inducido
ILs	Ionic liquids	Líquidos iónicos
IRMS	Isotope-ratio mass spectrometry	Espectrometría de masas con radioisótopo
IT	Ion trap	Trampa de iones
K_{cw}	Partition constant carbon-water	Constante de partición carbón-agua
K_{ow}	Partition constant octanol-water	Constante de partición octanol-agua
LLE	Liquid-liquid extraction	Extracción líquido-líquido

LODs	Limit of detection	Límite de detección
LOQs	Limits of quantification	Límites de cuantificación
LPME	Liquid-phase microextraction	Microextracción en fase líquida
LVI	Large volume injection	Inyección de grandes volúmenes
MAE	Microwave-assisted extraction	Extracción asistida por microondas
MASE	Membrane-assisted solvent extraction	Extracción con disolventes asistida por membranas
MASP	Microwave-assisted sample preparation	Preparación de muestra asistida por microondas
MS	Mass spectrometry	Espectrometría de masas
MSPD	Matrix solid-phase dispersion	Dispersión de la matriz en fase sólida
NCI	Negative chemical ionization	Ionización química negativa
NIST	National institute of standard and technology	Instituto nacional de estándares y Tecnología
NTP	National toxicology program	Programa nacional de toxicología
OES	Optical emission spectrometers	Espectrometro de emisión óptica
OMS	World Health Organization	Organización mundial de la salud
OPPs	Organophosphorus pesticides	Pesticidas organofosforados
PAH	Polycyclic aromatic hydrocarbons	Hidrocarburos aromáticos policíclicos
PBDEs	Polybrominated diphenyl ethers	Difeniléteres polibromados
PCBs	Polychlorinated biphenyls	Bifenilos policlorados
PCI	Positive chemical ionization	Ionización química positiva
PDMS	Polydimethylsiloxane	Polidimetilsiloxano

ACRÓNIMOS

PFE	Pressurized fluid extraction	Extracción con fluidos presurizados
PLE	Pressurized liquid extraction	Extracción con líquidos presurizados
PM	Molecular mass	Peso molecular
ppb	Part per billion	Partes por billón
PTFE	Polytetrafluoroethylene	Politetrafluoroetileno
PTV	Programmed-temperature vaporizing	Vaporización a temperatura programada
R	Recovery	Recuperación
rpm	Revolution per minute	Revoluciones por minuto
RSD	Relative standard deviation	Desviación estándar relativa
RTILs	Room temperature ionic liquids	Líquidos iónicos a temperatura ambiente
SBSE	Stir bar sorptive extraction	Extracción con barras agitadoras
SD	Standard deviation	Desviación estándar
SDME	Single drop microextraction	Microextracción con gota suspendida
SFE	Supercritical fluid extraction	Extracción con fluidos supercríticos
SFO	Solidification of floating organic drop	Solidificación de la gota orgánica flotante
SIM	Single ion monitoring	Monitorización de un solo ión
SIMS	Secondary ion mass spectrometry	Espectrometría de masas de iones secundarios
SPE	Solid-phase extraction	Extracción en fase sólida
SPME	Solid-phase microextraction	Microextracción en fase sólida
TOF	Time of flight	Tiempo de vuelo

USALLE	Ultrasound-assisted liquid-liquid extraction	Extracción liquid-líquido asistida por ultrasonidos
USAEME	Ultrasound-assisted emulsification extraction	Emulsificación-microextracción asistida por ultrasonidos
USE	Ultrasound-assisted solvent extraction	Extracción asistida por ultrasonidos
UV	Ultraviolet	Ultravioleta
VWD	Variable wavelength detection	Detector de longitud de onda variable

